

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Estudo da Prevalência de *Campylobacter* spp.
em frangos de carne em Portugal**

Francisco Miguel dos Santos Costa

Orientador:

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-orientador:

Professor Doutor Fernando Alberto Brandão Campos Lopes Moreira

Porto 2017

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Estudo da Prevalência de *Campylobacter* spp.
em frangos de carne em Portugal**

Francisco Miguel dos Santos Costa

Orientador:

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador:

Professor Doutor Fernando Alberto Brandão Campos Lopes Moreira

Porto 2017

Resumo:

Este trabalho consistiu em realizar um estudo de prevalência de *Campylobacter* spp ao longo da fileira produtiva. O estudo foi dividido em duas partes, sendo que a primeira, consistiu, em realizar um estudo nas explorações avícolas antes das aves irem para o abate. A segunda fase, consistiu em realizar amostras no cais de matadouro, antes dos animais serem abatidos. Foram amostradas explorações com características estruturais distintas, bem como métodos de manejo. Foram realizadas amostras através de recolhas fecais e também recolhas cutâneas.

De acordo com os dados obtidos devem ser tomadas medidas no sentido de diminuir estes valores. Tais medidas passam pela implementação de regras biossegurança, diminuição do tempo permanência das aves no cais, diminuição dos tempos de transporte, implementação de sistemas de jaulas mais eficazes no que diz respeito à contaminação fecal, assegurar uma padronização em todos os processos, assegurar uma correta formação de todos os colaboradores. As medidas passam também pela realização de estudos nas diversas fases do processo de abate, para averiguar qual o ponto da situação e instituir possíveis medidas. Reunir histórico das explorações, implementar e fazer cumprir um controlo de pragas rigoroso, são tudo possíveis medidas para combater e diminuir a prevalência de *Campylobacter* spp.

Agradecimentos

Aos meus Pais por sempre me terem apoiado de todas as formas possíveis e impossíveis , à Patricia por me ter apoiado sempre ajudado em tudo e durante todo o tempo. Ao Costa, Torres Carvalho Lacerda Nuno Lino, Pipoca Dias Osorio e todos os meus amigos! Ao Aires, à Moita, Marta, Filipe, Sara, Bouças à Monica, à Nala ao Lopes e Gil. Ao Professor Paulo Costa por ter aceitado este trabalho e por me ter apoiado e ajudado sempre, ao Dr. Fernando Moreira pela confiança depositada, por ter acreditado em mim quando as coisas não correram como deveriam, por ser incansável em tentar encontrar soluções sempre que surgiram contratempos, por tudo o que me ensinou e por todo o apoio. Ao Eng Pedro Ferreira por me permitir estagiar na área da reprodução Ao Eng João Borges, Eng Sara Garcia, Eng Mariana Alves e Eng Tiago Correia por tudo o que me ensinaram, que me ajudaram, e por se mostrarem sempre disponíveis. Ao Dr Luís Ferreira, ao Eng João José por me ter ajudado em inúmeras explorações, ao Eng Nuno, ao Dr Bruno Abreu por toda a disponibilidade quando foi necessário À Eng Dina , Ao Eng António Tomas e ao Eng André Conde , a todas as pessoas da Lusiaves com quem tive oportunidade de trabalhar. Ao Eng Dinis por estar sempre disponível na parte do matadouro.

A todas as pessoas do laboratório à Dra Ângela ,à Dona Elisabete à Dra Nanci , ao Dr Angelo , à Dra Sónia.

Aos Professores do ICBAS.

A todos os que sempre me apoiaram, a todos os que se cruzaram comigo e a todos os envolvidos direta e indiretamente neste trabalho.

Abreviaturas

mPCR	<i>Multiplex polymerase chain reaction</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCA	<i>Plate count agar</i>
FITC	(Isotiocianato de fluoresceína) para marcação de <i>Campylobacter</i> spp.;
DAPI	(4',6-diamidino-2-fenilindole) para marcação
CFB	<i>Campy food broth</i> (BioMérieux)

Índice

Resumo:	i
Agradecimentos	ii
Abreviaturas	iii
Índice	iv
Parte I	1
1. A Avicultura em Portugal e no mundo	1
Parte II	2
Resumo das atividades realizadas durante o estágio	2
Parte III – Estudo de Prevalência sobre <i>Campylobacter</i> spp.	3
1 - Introdução	3
2 - Características Microbiológicas	5
3 - Transmissão entre animais	6
4 - Doença nas aves	7
5 - Fatores de risco	8
6 – Materiais e métodos	9
6.1. Recolha das amostras	9
6.1.1. Método de recolha das amostras	9
6.1.1.1. Amostras fecais na exploração	9
6.1.1.2. Amostras cutâneas na exploração	10
6.1.1.3. Amostras fecais no matadouro	10
6.1.1.4. Amostras cutâneas no matadouro	11
6.1.1.5. Transporte das amostras para o laboratório	11
6.1.2. Mapa das explorações amostradas	11
6.1.2.1. Produção Própria	12
6.1.2.2. Criadores	12
6.2. Detecção e quantificação de <i>Campylobacter jejuni</i> através de microbiologia clássica e confirmação da espécie através de mPCR	12
6.3. Quantificação de <i>Escherichia coli</i> e Microrganismos Totais nas amostras cutâneas	13
6.4. Estudo morfológico para determinação de células viáveis mas não cultiváveis (<i>Campylobacter</i> spp.) através de <i>Fluorescent in situ hybridization</i>	13
6.5. Detecção de espécies <i>Campylobacter</i> spp por PCR multiplex	13
6.6. Quantificação de genomas do (<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i>) por qPCR	14
7 – Métodos de apanha	14
8 – Cais de abate	14
Resultados	15
1. Relação entre a contaminação das fezes por <i>Campylobacter</i> spp. e dados da produção	15

1.2. Relação entre fatores produtivos e contaminação das fezes por <i>Campylobacter</i> spp.	15
2. Relação entre a contaminação da pele por <i>Campylobacter</i> spp. e dados da produção:	16
3. Variação da presença de <i>Campylobacter</i> spp. nas fezes entre a exploração e o abate	17
4. Relação entre fatores produtivos e contaminação das fezes por <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	18
5. Relação entre fatores produtivos e contaminação da pele por <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	19
Discussão/Conclusão	22
Estratégias de controlo	28
Bibliografia	30
Anexos	38

Parte I

1. A Avicultura em Portugal e no mundo

A avicultura apresenta uma evolução contínua ao longo dos anos quer, do ponto de vista das performances quer dos resultados económicos. Após a Segunda Guerra Mundial, vincou-se a necessidade de produzir alimentos com um custo inferior. Nessa fase, as fábricas de ração, produtores, transportadores e centros de incubação funcionavam como entidades distintas e independentes, mas em pouco tempo surgem alterações do ponto de vista organizacional que permitiram à avicultura atingir os padrões de produtividade que hoje conhecemos. Tais alterações conduziram à interligação e comunicação entre os centros de incubação e os produtores, para, desta forma, ambos conseguirem atingir padrões produtivos mais elevados. Estava dado o primeiro passo para a verticalização do processo. Mais tarde, surge também a integração no processo de fábricas de alimentos compostos, passando os grandes grupos produtivos a ser detentores de grande parte dos processos. Em meados dos anos 60 grande parte dos frangos produzidos provinha de empresas com a verticalização do processo.

Em meados dos anos 60, surgem também empresas especializadas detentoras da genética e de linhas reprodutivas. Tais empresas fornecem os animais reprodutores que irão gerar ovos incubáveis, que posteriormente à incubação originam pintos. Ao longo das décadas estas empresas conseguiram acelerar o crescimento, reduzir os índices de conversão e aumentar a percentagem de musculatura das carcaças. Todo este caminho e seleção permitiram que hoje se produzam frangos com aproximadamente 2 kg em apenas 35 dias e com um índice de conversão que varia entre 1,5 e 1,8.

Atualmente, a avicultura continua a ser uma das indústrias do sector agroalimentar com altas taxas de crescimento, uma vez que as propriedades das chamadas carnes brancas, segundo a FAO, são altamente vantajosas, para um estilo de vida saudável cada vez mais procurado pela população. As suas propriedades, no que diz respeito à qualidade da proteína e à baixa relação proteína-gordura, vitaminas e minerais, elegem-nas para uma dieta equilibrada e transversal a todas as faixas etárias. Alguns estudos epidemiológicos comprovam também que o consumo moderado de carne de aves reduz o risco de desenvolvimento de obesidade, diabetes e tumores.

No que diz respeito ao consumo a nível nacional, na última década verificou-se um aumento total do consumo da carne de aves de capoeira na ordem das 100 mil toneladas. Anualmente os portugueses consomem em média 35,6 kg por habitante.

Em virtude da produção ter um custo mais baixo que as outras carnes, a carne das aves é uma possível solução para as necessidades alimentares dos países em vias de desenvolvimento, fazendo face à difícil tarefa que é “alimentar um mundo” com uma população cada vez maior e com crescente escassez de recursos.

No que concerne ao tipo de produção de carne, existem dois grandes sistemas: o sistema intensivo e o sistema extensivo. O sistema intensivo é aquele que permite atingir mais rapidamente o objetivo, uma vez que os animais estão confinados a ambientes controlados e com alimento e água “*ad libitum*”. Este sistema utiliza densidades animais maiores, para obter o máximo de rentabilidade dos espaços e equipamentos. No que diz respeito à produção extensiva, esta visa a produção de animais mais rústicos, designado “frangos do campo”. Estes animais possuem acesso ao exterior, são de estirpes diferentes e como tal em termos de características organoléticas são substancialmente diferentes. Para ser considerado “frango do campo” criado em regime de “Ar-livre” as aves devem ter um mínimo de 81 dias de idade (antes do abate) e ter acesso a um parque exterior cobertos de vegetação.

Parte II

Resumo das atividades realizadas durante o estágio

Durante todo o tempo que durou estágio no Grupo Lusiaves, foram percorridas várias etapas da fileira produtiva, tendo estas sido determinantes para a compreensão da importância e da complexidade que este tema apresenta. Foram acompanhados desde do início alguns bandos na produção própria e tive oportunidade de acompanhar diferentes técnicos, o que me permitiu adquirir conhecimentos e competências totalmente distintas. Foram acompanhados vários bandos com diferentes problemas de produtividade e quadros clínicos; Realizaram-se exaustivamente necropsias, tendo sido observadas algumas patologias, como por exemplo: coccidiose, doença de gumboro, colibaciloses, etc.; Acompanhou-se algumas cargas de pintos-do-dia, assim como os processos de manejo que são necessários efetuar antes da receção dos animais: assegurar a adequação da temperatura e humidade do pavilhão, verificar que as linhas de água estão a funcionar corretamente e que os sistemas de aquecimento e alarmes estão devidamente ativos. Assistiu-se também à recolha (apanha) de animais e ao seu acondicionamento no transporte até ao matadouro. Mais tarde houve oportunidade de acompanhar o sector da reprodução (recria, produção e centro de incubação). Em termos gerais, na parte de recria e produção houve oportunidade de acompanhar diferentes técnicos. Na parte de recria seguiu-se de perto todo o programa profilático vacinal, bem como todo o complexo manejo dispensado a estas aves. No que diz respeito ao centro de incubação houve oportunidade de realizar inúmeros embriodiagnósticos e estabelecer relação com possíveis problemas nas quintas de produção. Durante as recolhas das amostras para o estudo do *Campylobacter* spp., houve também interesse em conhecer exaustivamente o matadouro e as diferentes etapas do processo de abate, bem como trocar ideias e conhecimentos com alguns Médicos Veterinários Oficiais e todos os restantes trabalhadores.

Todas estas etapas, foram sem dúvida, muito importantes na formação e no estágio curricular já que permitiram adquirir uma visão alargada de toda a avicultura, dos desafios atuais, das possíveis soluções e dos futuros problemas.

Durante a recolha das amostras para o estudo sobre *Campylobacter*, foi também muito importante ser confrontado com diferentes realidades produtivas, quer do ponto de vista da biossegurança, quer no que diz respeito ao bem-estar animal e ao manejo. Conheci as mais diversas pessoas e troquei ideias sobre como desenvolvem o seu trabalho de manejo e quais os principais desafios no seu dia-a-dia.

Uma vez que o estágio teve início em Agosto (sob a forma de extra-curricular) e terminou em Maio, tive também oportunidade de observar patologias que apresentam algum carácter mais sazonal, bem como comprovar as dificuldades inerentes às diferentes estações do ano.

Parte III – Estudo de Prevalência sobre *Campylobacter* spp.

1 - Introdução

Desde de há muitos anos que o género *Campylobacter* tem sido a maior causa de surtos de doença gastrointestinal em humanos na Europa e nos restantes países industrializados (WHO 2011;EFSA 2014; ECDC 2014). O número de casos confirmados na Europa em 2014 foi de 236 851 e houve um aumento de 22 067 casos, o que representa um aumento de 10% face a 2013 (EFSA 2014). Em 2013 notificaram-se 71 casos por 100 00 habitantes na União Europeia (EFSA 2014)

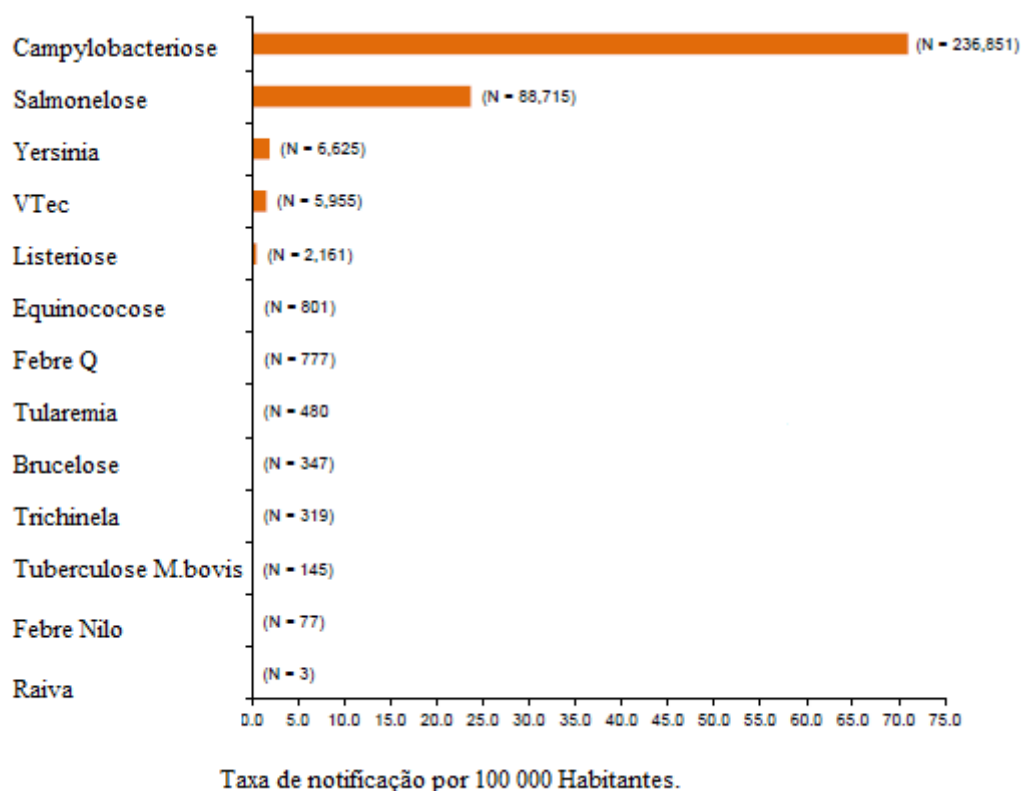


Figura 1 - Zoonoses casos 2014 (Adaptado de EFSA 2014)

O agente pode ser encontrado no trato gastrointestinal normal dos frangos (Ansari-Lari *et al.* 2011), sendo a carne de frango a maior fonte de contaminação e reservatório a nível mundial (Wingstrand *et al.* 2006; EFSA 2010; Boysen *et al.* 2013; Muellner *et al.* 2013; Mughini *et al.* 2012;).

Campylobacter coli e *Campylobacter jejuni* são capazes de infetar frangos (Keller *et al.* 2007; Haruna *et al.* 2012), sendo os agentes responsáveis por 98% dos casos confirmados de campilobacteriose em humanos (Crim *et al.* 2013).

Em relação à prevalência de *Campylobacter* na Europa, foi determinada como sendo de 0,6% a 13,1% nos países nórdicos, como Finlândia, Noruega e Suécia e entre 74,2% e 80% noutros países europeus. Há portanto uma diferença considerável no que diz respeito aos países do norte e do sul da europa (EFSA 2014).

Para além da infeção dos humanos através da ingestão de carne de frango, é também possível a infeção ocorrer através do contato com animais domésticos, animais selvagens e insetos portadores, consumo de água infetada, ou ingestão de qualquer outro género alimentício que contenha *Campylobacter* (Humphrey *et al.* 2007; Kaakoush *et al.* 2015). No entanto, a carne de frango insuficientemente cozinhada é, sem dúvida, a principal fonte de infeção em humanos (Sheppard *et al.* 2014). Em 2014 foi encontrado *Campylobacter* em 30.7% dos 13 603 animais testados (EFSA 2014).

As pessoas com idades inferiores a cinco anos, os jovens adultos (entre 20 e 40 anos) e os idosos com mais de 75 anos são os grupos mais afetados (Skarp *et al.* 2016). Nos países em desenvolvimento a doença ocorre em crianças com menos de 5 anos (Oberhelman 2000), enquanto em países desenvolvidos constata-se que os jovens adultos também são suscetíveis de desenvolver a doença (Keener *et al.* 2004). Está também descrito que o *Campylobacter* é uma das maiores causas associadas ao síndrome de Guillain Barré em humanos (Olson *et al.* 2008).

A maioria dos pacientes infetados com *Campylobacter* recupera da infeção com tratamento sintomático e de suporte apenas com eletrólitos e reposição de fluidos. A utilização de antibióticos está reservada para situações em que o curso da doença é mais severo (Alfredson & Korolik 2007). Neste caso está indicada a utilização de fluoroquinolonas ou tetraciclina. No entanto, o que se tem verificado é um aumento da resistência antimicrobiana (Bolton 2015).

No que diz respeito aos animais, estes são normalmente portadores assintomáticos de *Campylobacter*. No entanto, estudos recentes comprovam que o *Campylobacter* pode ter efeito no bem-estar animal (Sommer *et al.* 2016).

Em relação à prevalência de *Campylobacter* nos bandos de frangos, esta é mais alta nos meses de verão, estando este facto relacionado com o grande aumento no número de potenciais vetores correlacionado com o aumento da temperatura (Barrios *et al.* 2006). O tipo de produção avícola também pode influenciar a presença ou ausência de *Campylobacter*, reconhecendo-se que as explorações extensivas e mais biológicas apresentavam uma prevalência consideravelmente mais elevada, contrariamente as explorações intensivas clássicas. Esta diferença de níveis de *Campylobacter* deve-se essencialmente ao facto dos animais em exploração ao ar livre estarem mais expostos a fatores contaminantes e poderem ter contato com outros animais que sejam portadores de *Campylobacter* (Fernandez *et al.* 1993).

2 - Características Microbiológicas

A família Campylobacteraceae é constituída por dois géneros: *Campylobacter* e *Arcobacter*. Ambos são considerados, principalmente, como comensais, tanto em humanos como em animais (Seliwiorstow *et al.* 2016).

O género *Campylobacter* integra bastonetes Gram negativo não formador de esporos com dimensões da ordem de $0.2\text{--}0.8\mu\text{m}\times 0.5\text{--}5\mu\text{m}$. O género *Campylobacter* contém 26 espécies, 2 espécies provisórias e 9 subespécies (Kaakoush *et al.* 2015). A maioria das espécies possui um flagelo numa ou em ambas as extremidades da célula. As únicas exceções são *Campylobacter gracilis* que não apresenta motilidade e *Campylobacter showae* que apresenta múltiplos flagelos (Vandamme *et al.* 2008).

No que diz respeito à antibioterapia, muitas estirpes são resistentes à atuação das fluoroquinolonas (Hazeleger *et al.* 1995). Em condições desfavoráveis estes microrganismos tem capacidade para formar células viáveis mas não cultiváveis (Portner *et al.* 2007). No entanto, muitas questões têm sido levantadas no que diz respeito aos mecanismos que levam à conversão de células viáveis não cultiváveis para a forma cultivável. As espécies termofílicas de *Campylobacter* apresentam capacidade de crescimento entre 37 e 42°C, com uma temperatura ótima de 41.5°C, sendo o seu crescimento inibido a temperaturas inferiores a 30°C (Levin 2007). Em relação ao ambiente, *Campylobacter* necessita de uma atmosfera especial com 5% de oxigénio, 10% de dióxido de carbono e 85% de nitrogénio (Garénaux *et al.* 2008; Stern & Kazmi 1989). A utilização de aminoácidos é fundamental para o *Campylobacter jejuni*, uma vez que protege a bactéria do stress oxidativo e osmótico (Booth & Higgins, 1990). Já no que diz respeito à sensibilidade de crescimento em meios com NaCl, o *Campylobacter* é sensível a concentrações água/volume superiores a 2% (Cesare *et al.* 2003).

Estas bactérias são inativadas através da congelação durante 3 dias a uma temperatura de -15 °C (Stern & Kotula 1982). A presença de locais, no DNA, suscetíveis de sofrerem mutações existentes no genoma de *Campylobacter jejuni*, é responsável pela rápida adaptação a um novo hospedeiro (Jerome *et al.* 2011).

3 - Transmissão entre animais

A transmissão de *Campylobacter* ocorre maioritariamente por via horizontal (Newell *et al.*, 2011), sendo proveniente de várias fontes. Contudo, no que diz respeito à transmissão vertical, a situação permanece pouco clarificada (Cox *et al.* 2012). Foi detetado *Campylobacter* no oviduto das galinhas poedeiras, potenciando a sua transmissão através dos ovos (Buhr *et al.* 2002; Fonseca *et al.* 2006), embora as possibilidades de sobrevivência na clara ou casca do ovo sejam remotas (Whyte *et al.* 2001; Bull *et al.* 2006).

Já no que diz respeito aos tempos de infeção, os frangos raramente são infetados antes dos 14 dias (Bull *et al.* 2006), em virtude de ainda estarem presentes anticorpos maternos (Hermans *et al.* 2012). A alta taxa de infeção, a severidade pós-infeção e o aumento da resistência aos antibióticos tornam este microrganismo muito importante no que diz respeito à saúde pública (Svensson *et al.* 2015).

As fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, e os macrólidos, como a eritromicina, foram os primeiros antibióticos a ser utilizados na campilobacteriose em humanos. A resistência às quinolonas necessita apenas que ocorra mutação no gene *gyrA*. Há uma clara associação entre o uso de fluoroquinolonas na produção animal e o aumento da resistência em isolados de *Campylobacter* de humanos e de isolados de produção animal (Wieczorek & Osek 2013). No que diz respeito a países em

que não é permitido o uso de fluorquinolonas na avicultura, verifica-se que existem muito menos variantes/estirpes resistentes do que em países onde é permitido (Garcia-Migura *et al.* 2014).

Em 2013 a resistência à ciprofloxacina em isolados de *Campylobacter* em humanos na União Europeia encontrava-se entre os 23% em isolados provenientes da Dinamarca, enquanto em isolados provenientes de Espanha a resistência era de 93%. Em relação a isolados de *Campylobacter* provenientes de broilers obtidos em matadouro, a resistência à ciprofloxacina encontrava-se em 0% na Finlândia e 90% em Espanha (EFSA 2014).

No que diz respeito à utilização de fagos para diminuir a concentração de *Campylobacter*, estaremos apenas a selecionar as estirpes resistentes aos fagos sem conseguir os baixos níveis pretendidos (Hammerl *et al.* 2014).

4 - Doença nas aves

A primeira vez que o *Campylobacter* foi associado a doença em aves foi em casos de hepatite vibriónica aviária (Tudor 1954), embora tenha sido refutada mais tarde (Soerjadi *et al.* 1982). No entanto, estudos recentes comprovam realmente a existência de relação de *Campylobacter jejuni* e a hepatite vibriónica aviária (Jennings *et al.* 2011).

Campylobacter jejuni pode invadir a mucosa intestinal (Van Deun *et al.* 2008), mas também pode ser encontrado noutros órgãos (Jennings *et al.* 2011)(Figura 11, em Anexo)

Alguns estudos mostram evidências de animais infetados com diferentes espécies de *Campylobacter* apresentam alterações no crescimento e ganho de peso (Awad *et al.* 2014; Awad *et al.* 2015).

A colonização intestinal por *Campylobacter* leva a alterações histo-morfológicas a nível do jejuno (Humphrey *et al.* 2014), bem como a alterações no transporte dos eletrólitos com uma diminuição da absorção de nutrientes a nível intestinal (Awad *et al.* 2015). Após a infeção por, *Campylobacter jejuni*, este pode alcançar o ceco, multiplicando-se e estabilizando 24 horas após infeção após a infeção (Coward *et al.* 2008).

Para ser capaz de atingir e colonizar eficazmente o trato gastrointestinal, o *Campylobacter* possui a capacidade de se adaptar a muitos ambientes adversos, tais como altas variações de pH, e de oxigénio disponível, ao stress oxidativo, ao aumento da pressão osmótica, bem como à presença de ácidos biliares (Louis & O'Byrne 2010). Um bando pode ser infetado com uma única estirpe mas, no caso de explorações com reduzida biossegurança, há evidências que indicam que podem ser afetados por múltiplas estirpes (Jorgensen *et al.* 2011).

5 - Fatores de risco

Um dos principais fatores de risco para a contaminação com *Campylobacter* é a presença de animais silvestres nas imediações das explorações, tendo este facto sido descrito por vários autores citado por Newell & Fearnley 2003. Está também descrito que animais domésticos como cães e gatos também podem servir de reservatório ao *Campylobacter* (Gregory *et al.* 1997; Keller *et al.* 2007). Animais selvagens e portadores de *Campylobacter* são também importantes fatores de risco para a transmissão de *C. jejuni* para os bandos de animais assim como porcos, vacas e ovelhas podem ser considerados reservatórios e vetores de *Campylobacter* (Hermans *et al.* 2012).

A presença de bactérias no solo, nas imediações dos pavilhões, pode também funcionar como um dos potenciais fatores de risco; daí que uma das medidas de biossegurança seja garantir que nas imediações dos pavilhões haja uma área pavimentada (Rivoal *et al.* 2005). Em relação ao tamanho do bando também está descrito que quanto maior é o bando, maior é a prevalência do *Campylobacter* (Barrios *et al.* 2006; Berndtson *et al.* 1996).

No que diz respeito à sobrevivência do *Campylobacter* na água, a presença de Amoeba e Algae pode ser relevante uma vez que o *Campylobacter* pode colonizar estes protozoários. (Axelsson-Olsson *et al.* 2005; Snelling *et al.* 2005).

Os diversos estudos revelam que há uma maior incidência de *Campylobacter* nos meses mais quentes sugerindo uma relação com aumento da população de insetos, que são importantes vetores (Rattenborg & Madsen 2001; Hansson *et al.* 2007). Durante o inverno as precipitações podem criar reservatórios de águas paradas, onde pode persistir *Campylobacter*, que futuramente irá infetar vetores (Jorgensen *et al.* 2011). A pouca rotatividade de desinfetantes utilizados nos pedilúvios bem como nos restantes mecanismos de biossegurança representa também um maior risco de infeção (McDowell *et al.* 2008).

A forma como o organismo se comporta perante ambientes desfavoráveis permanece pouco clara, mas é evidente que a bactéria apresenta mecanismos de defesa face a estes fatores de stress (Murphy *et al.* 2006). Foi comprovado “in vitro” que a presença do transmissor norepinefrina estimula o crescimento e motilidade de *C. jejuni* (Cogan *et al.* 2007; Jennings *et al.* 2011). Como resultado, o stress causado nos animais através dos desbastes vai contribuir para um maior crescimento bacteriano no trato gastrointestinal, o que leva a que haja uma maior excreção de *Campylobacter* e consequentemente uma maior propagação da bactéria (Cogan *et al.* 2007). Por sua vez ao melhorar o bem-estar animal estamos a contribuir para uma diminuição da colonização das aves por *Campylobacter* (Bull *et al.* 2008).

A alteração natural do genoma constitui uma grande forma de variabilidade e de adaptação a fatores de resistência a antibióticos (Boer *et al.* 2002; Wilson *et al.* 2003; Mughini *et al.* 2012;).

Há evidências que permitem afirmar que apesar de um bando ser *Campylobacter* negativo pode sofrer contaminação cruzada no cais de matadouro. daí ser importante reduzir o tempo de espera antes do abate (Potturi-Venkata *et al.* 2007). Os veículos, o material de apanha e o pessoal de apanha podem ser fontes de contaminação dos bandos. Uma das formas de minimizar a contaminação cruzada será organizar em termos logísticos o abate de bandos positivos e negativos em diferentes alturas do dia (Ridley *et al.* 2011). A depena e a evisceração no abate surgem como grandes fontes de contaminação (Lopez *et al.* 2003). Em relação as densidades que podem ser atingidas no trato gastrointestinal podem ser na ordem dos 10^8 UFC por grama (Rosenquist *et al.* 2006).

6 – Materiais e métodos

6.1. Recolha das amostras

6.1.1. Método de recolha das amostras

6.1.1.1. Amostras fecais na exploração

Com o auxílio de uma espátula recolheram-se pequenas porções de fezes frescas que foram depositadas num saco estéril até perfazer um mínimo de 100g. Como tal o pavilhão foi percorrido em duas diagonais, respeitando sempre os seguintes passos de forma a garantir a uniformidade da amostra:

- Recolher porções de fezes equivalentes (*i.e.* recolher pequenas quantidades apenas com a extremidade da espátula);
- Recolher amostras em intervalos regulares definidos em função da dimensão do pavilhão de forma a efetuar um total de 20 recolhas por diagonal;

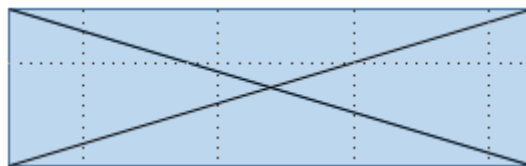


Figura 2- Recolha das amostras de fezes exploração.

6.1.1.2. Amostras cutâneas na exploração

As amostras foram recolhidas com o auxílio de pequenos novelos de gaze humedecidos em meio de cultura Triptona Sal (Oxoid) para aumentar a captação de material. Os novelos foram manipulados com o auxílio de uma pinça hemostática esterilizada. A gaze dorsal foi recolhida ao longo da linha média dorsal entre a base do pescoço e o uropígio (Figura 2), aplicando alguma tensão de forma a melhorar o contacto com a pele. Por sua vez, a gaze ventral foi recolhida com recurso aos mesmos novelos usados na linha dorsal, depois de reposicionados na pinça hemostática com o auxílio das mãos protegidas com luvas limpas. Desta forma, ambas as extremidades dos novelos contactavam com um segmento de pele com um centímetro de largura e 40 cm de comprimento: 20 cm no dorso e 20 cm na face ventral do corpo. Em cada bando, o procedimento foi repetido em 20 frangos. Os 20 novelos de gaze respeitantes à mesma amostra foram recolhidos num saco estéril.

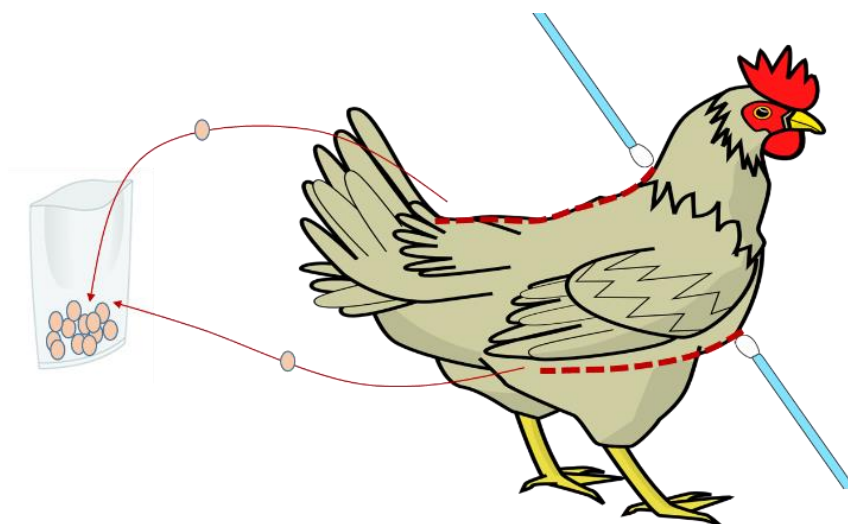


Figura 3 - Método de recolha das amostras cutâneas, indicando (tracejado vermelho) a zona da pele dos frangos a percorrer com os novelos de gaze humedecidos.

6.1.1.3. Amostras fecais no matadouro

Depois de confirmada a identidade do lote, foram recolhidas com o auxílio de uma espátula pequenas porções de fezes frescas através dos interstícios das jaulas. À semelhança da recolha na exploração de origem, assegurou-se um mínimo de 100 g de fezes frescas recolhidas em pelo menos 25 pilhas de jaulas diferentes, tendo o cuidado de amostrar jaulas posicionadas nos níveis centrais de cada pilha.

6.1.1.4. Amostras cutâneas no matadouro

No centro de abate recolheram-se amostras cutâneas tal como descrito anteriormente. Em cada lote amostraram-se 20 frangos retirados aleatoriamente de um igual número de jaulas presentes em diferentes torres.

6.1.1.5. Transporte das amostras para o laboratório

O transporte das amostras para o MicroLab foi assegurado pela Lusiaves. Entre a recolha e o processamento, as amostras foram mantidas em microaerofilia (acondicionadas num contentor estanque com um gerador *Campygen* 2.5 L (Thermo Scientific)) e refrigeradas a uma temperatura entre 8 e 15°C (caixa isotérmica com cargas térmicas). As amostras fecais e cutâneas oriundas das explorações avícolas foram processadas 24 ± 4 h após a colheita, enquanto as amostras recolhidas no cais do matadouro foram processadas num intervalo de 16 ± 6 h.

6.1.2. Mapa das explorações amostradas

A Figura 4 apresenta as explorações avícolas amostradas no âmbito do estudo de prevalência do *Campylobacter*, sendo possível observar em detalhe as explorações avícolas da zona centro de Portugal.

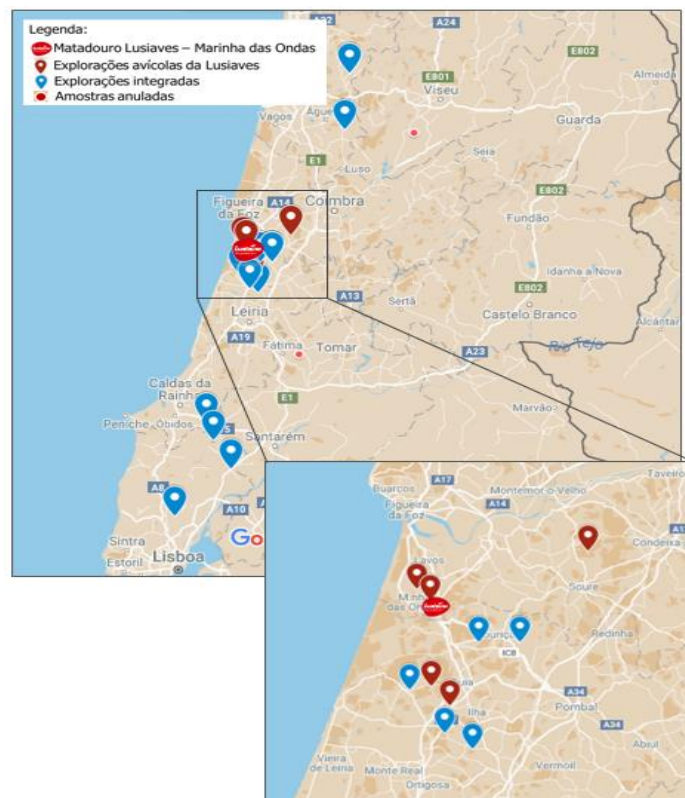


Figura 4 - Distribuição geográfica das explorações avícolas amostradas (Portugal).

6.1.2.1. Produção Própria

No que diz respeito à produção própria do Grupo Lusiaves, há uma padronização dos processos nas diferentes explorações, com o intuito de maximizar e otimizar os resultados produtivos. Esta padronização, tanto a nível técnico como a nível de condições e materiais, é determinante para cumprir rigorosamente as metas pretendidas. No que diz respeito às normas de biossegurança, são transversais a todas as unidades de produção.

6.1.2.2. Criadores

Nas explorações dos criadores integrados, verifica-se uma grande heterogeneidade de instalações e metodologias de trabalho. No que diz respeito às instalações há uma grande discrepância, com alguns criadores dotados de melhorias e equipamentos tecnológicos recentes, tanto para a distribuição da água e alimento, como para a ventilação. Mas também há criadores que não recorrem à automatização, sendo a ventilação efetuada com janelas de abertura manual.

Os criadores, na sua grande maioria possuem explorações com capacidade de alojamento total relativamente baixa, entre os 5000 e 40000 animais e normalmente possuem entre dois a quatro pavilhões. Cada criador possui a sua forma de efetuar o manejo, daí ser difícil uma padronização de todos os processos. Esta situação pode levar a resultados produtivos completamente distintos em explorações equiparáveis. Uma das grandes dificuldades de trabalhar neste sistema é dar formação técnica às pessoas e reduzir certos comportamentos de risco, dado que os hábitos já estão sedimentados e são difíceis de alterar.

6.2. Detecção e quantificação de *Campylobacter jejuni* através de microbiologia clássica e confirmação da espécie através de mPCR

A deteção e quantificação das células cultiváveis de *Campylobacter* spp. baseou-se nos procedimentos descritos na Norma ISO/FDIS 10272-1 que define o método horizontal para a pesquisa (parte 1) e enumeração (parte 2) de *Campylobacter* spp. em géneros alimentícios e alimentos para animais. No que diz respeito às amostras fecais, depois de bem homogeneizadas, suspenderam-se 25 g de fezes em 225 ml de *Campy Food Broth* (CFB) (BioMérieux). Após homogeneização manual e um período de revitalização de 30 minutos à temperatura ambiente, efetuaram-se diluições decimais em Triptona Sal (TS) (Oxoid) até à diluição [-5]. Através da técnica de espalhamento superficial, inocularam-se 100µl de cada diluição em placas com o meio de cultura *CampyFood Agar* (CFA).

Relativamente às zaragatoas cutâneas, aos 20 novelos de cada amostra adicionam-se inicialmente 10 ml de CFB. Após um período de revitalização de 30 minutos à temperatura ambiente,

inocularam-se 100 µl numa placa com CFA e adicionaram-se mais 90mL de CFB, perfazendo um total de 100mL. Posteriormente, inocularam-se 100µl desta suspensão numa outra placa com CFA. Ambas as placas foram incubadas em microaerofilia durante 48 h a 72 h, primeiro a 37°C durante 4 h a 6 h e, posteriormente a 41.5°C. A partir da placa com 15 a 150 colónias típicas, selecionaram-se 5 colónias para confirmação fenotípica e bioquímica. Todos os isolados com morfologia e bioquímica compatível com o género *Campylobacter* foram confirmados por PCR (Yamazaki-Matsune *et al.* 2007). A realização de um PCR multiplex serviu, também, para identificar as espécies de *Campylobacter* correspondentes a cada morfologia tipo detetada nas placas de contagem com o meio CFA. Os resultados foram expressos, consoante a natureza das amostras, em Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/g de fezes e UFC/cm² de pele. Na eventualidade de nenhuma das placas evidenciar o crescimento de colónias típicas (< 100 UFC/g de fezes <0,4UFC/cm² de pele), procedeu-se ao enriquecimento das amostras em CFB incubado em microaerofilia a 37°C durante 4 h a 6 h e, depois a 41.5°C durante 44 h ± 4 h.

6.3. Quantificação de *Escherichia coli* e Microrganismos Totais nas amostras cutâneas

A partir de 1 ml da suspensão inicial fizeram-se diluições decimais em Triptona Sal (Oxoid) até à diluição [-7] e inocularam-se, por espalhamento superficial, 100µl de cada diluição em placas com TBX (Oxoid) e *Plate Count Agar* (Biokar) (PCA) para contagem de *E. coli* a Microrganismos Totais, respetivamente. As placas com TBX foram incubadas a 44,5°C durante 24 h, enquanto as placas com PCA foram incubadas a 30°C durante 72 h. O resultado (expresso em UFC/cm²) foi obtido a partir da placa de TBX com 15 a 150 colónias azuis típicas (*E. coli*) e da placa de PCA com 30 a 300 colónias (Microrganismos Totais).

6.4. Estudo morfológico para determinação de células viáveis mas não cultiváveis (*Campylobacter* spp.) através de *Fluorescent in situ hybridization*

Pesquisou-se *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e de pele pela técnica de *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) de acordo com Poppert *et al.* 2008.

6.5. Detecção de espécies *Campylobacter* spp por PCR multiplex

Determinou-se a presença de várias espécies de *Campylobacter* spp. nas amostras de fezes e pele por PCR multiplex como descrito por Yamazaki-Matsune *et al.* 2007. Foram pesquisadas seis espécies

de *Campylobacter* spp.: *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis*.

6.6. Quantificação de genomas do (*Campylobacter jejuni* e *C. coli*) por qPCR

Determinou-se o número de cópias de genoma de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* nas amostras de fezes e pele por PCR em tempo real (qPCR) como descrito por Vondrakova *et al.* 2014.

7 – Métodos de apanha

Os desbastes e recolha total do bando para o abate são realizados por equipas maioritariamente ao anoitecer e durante a noite, para assegurar que o processo de abate se possa iniciar normalmente, por volta da meia-noite. Para isso os animais têm que passar por um período de jejum prévio de seis horas, de forma a reduzir a presença de alimento no papo. A apanha propriamente dita é efetuada por várias pessoas. O número de animais por jaula em cada apanha vai diferir no que concerne ao tamanho, peso e idade dos animais. A apanha deve demorar o menor tempo possível, aproximadamente duas horas já que este processo é bastante stressante para as aves e, como referido anteriormente, pode provocar um aumento da excreção do *Campylobacter*.

As pessoas que constituem a equipa de apanha devem utilizar preferencialmente equipamentos diferentes nas diferentes explorações e devem, antes de entrar na exploração e pavilhões, utilizar os pedilúvios para reduzir a possibilidade de contaminação. No que diz respeito às luvas utilizadas na apanha, são uma possível fonte de transmissão. No caso das explorações serem negativas, podem ser infetadas e posteriormente ocorrer a transmissão horizontal. As jaulas e a sua desinfeção deve ser efetuada de forma rigorosa, com detergentes e desinfetantes apropriados para impedir que sejam também uma fonte de contaminação. Já no que diz respeito ao veículo de transporte, este é uma das possíveis fontes de contaminação de outras explorações daí ser essencial proceder à correta lavagem e desinfeção após a descarga no matadouro.

8 – Cais de abate

Antes de se iniciar o abate propriamente dito e após a apanha, as aves permanecem no cais do matadouro. Esta estadia induz stress aos animais, pelo que a melhor forma de o reduzir será encurtar o tempo de permanência no cais, uma vez que quando é realizada a apanha já há um jejum de aproximadamente seis horas e, no que diz respeito a questões legais do bem-estar animal, as doze horas de jejum não devem ser ultrapassadas.

Resultados

Relativamente às amostras das fezes recolhidas na exploração, as que foram positivas a *Campylobacter* spp., também se revelaram positivas a nível do matadouro, sendo que, em termos quantitativos, verifica-se que há um aumento considerável.

1. Relação entre a contaminação das fezes por *Campylobacter* spp. e dados da produção

1.1. Tempo (data de recolha da amostra)

Não parece haver efeito da data de recolha da amostra na contaminação das fezes por *Campylobacter* spp.

1.2. Relação entre fatores produtivos e contaminação das fezes por *Campylobacter* spp.

Com base na correlação de Spearman, não parece haver associação entre as variáveis produtivas quantitativas e a contaminação das fezes por *Campylobacter* spp., nomeadamente:

- Efetivo total na exploração (número de aves);
- Dimensão do bando (número de aves);
- Duração do vazio sanitário (dias);
- Densidade vital (aves/m²);
- Idade (dias);
- Peso vivo no abate (kg);
- Índice de conversão alimentar;
- Consumo alimentar do bando (toneladas);
- Mortalidade acumulada (%);
- Tempo entre o primeiro desbaste na exploração e a recolha da amostra (dias);
- Tempo entre o primeiro desbaste do bando e a recolha da amostra (dias);
- Tempo entre a última administração de antibiótico e a recolha da amostra (dias);

Com base na correlação de Spearman, parece haver uma relação inversa ($\rho = -0,3491$; $p = 0.0293$, teste de uma cauda) com a eficácia produtiva.

Relativamente às variáveis produtivas categóricas, nenhuma se revelou significativamente associada com a contagem de *Campylobacter* spp. nas fezes. Ainda assim, o desinfetante da Mistolin, DMC-80, parece estar associado a uma menor excreção através das fezes e a uma menor contaminação da pele.

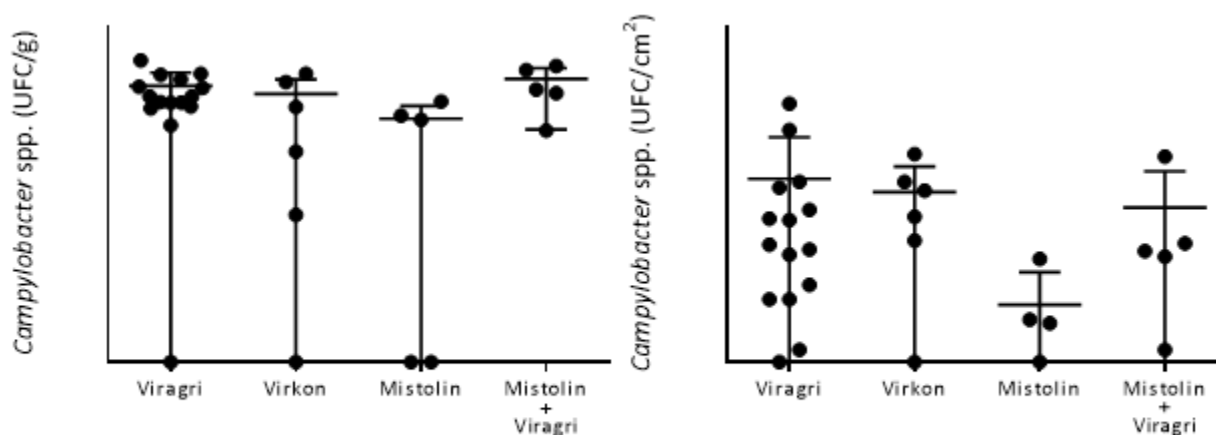


Gráfico 1 - Relação entre o desinfetante utilizado e a quantificação de *Campylobacter* spp. nas fezes e na pele.

2. Relação entre a contaminação da pele por *Campylobacter* spp. e dados da produção:

2.1. Tempo (data de recolha da amostra)

O efeito da data de recolha da amostra na contaminação da pele por *Campylobacter* spp. parece ser ainda mais reduzido quando comparado com a contaminação das fezes.

2.2. Relação entre fatores produtivos e contaminação da pele por *Campylobacter* spp.

Com base na correlação de Spearman, parece haver associação entre as variáveis produtivas quantitativas e a contaminação da pele por *Campylobacter* spp., nomeadamente:

- Eficácia produtiva, em que parece ter uma relação inversa ($\rho = -0,3417$; $p = 0,0323$, teste de uma cauda);
- Peso vivo no abate (kg), em que a associação parece ser inversa ($\rho = -0,3100$; $p = 0,044$, teste de uma cauda);
- Mortalidade acumulada (%), em que parece ter uma relação direta ($\rho = 0,4310$; $p = 0,0077$, teste de uma cauda).
- Contaminação das fezes por *Campylobacter* spp., em que a associação parece ser direta ($\rho = 0,3467$; $p = 0,0280$, teste de uma cauda).

Relativamente às variáveis produtivas categóricas, nenhuma se revelou significativamente associada com a contagem de *Campylobacter* spp. na pele.

Com base na correlação de Spearman, não parece haver associação entre as variáveis produtivas quantitativas e a contaminação da pele por *Campylobacter* spp., nomeadamente:

- Efetivo total na exploração (número de aves);
- Dimensão do bando (número de aves);
- Duração do vazio sanitário (dias);
- Densidade vital (aves/m²);
- Idade (dias);
- Índice de conversão alimentar;
- Consumo alimentar do bando (toneladas);
- Tempo entre o primeiro desbaste do bando e a recolha da amostra (dias);
- Tempo entre a última administração de antibiótico e a recolha da amostra (dias).

3. Variação da presença de *Campylobacter* spp. nas fezes entre a exploração e o abate

Entre a exploração e a entrada na linha de abate, o nível de presença de *Campylobacter* spp. aumentou.

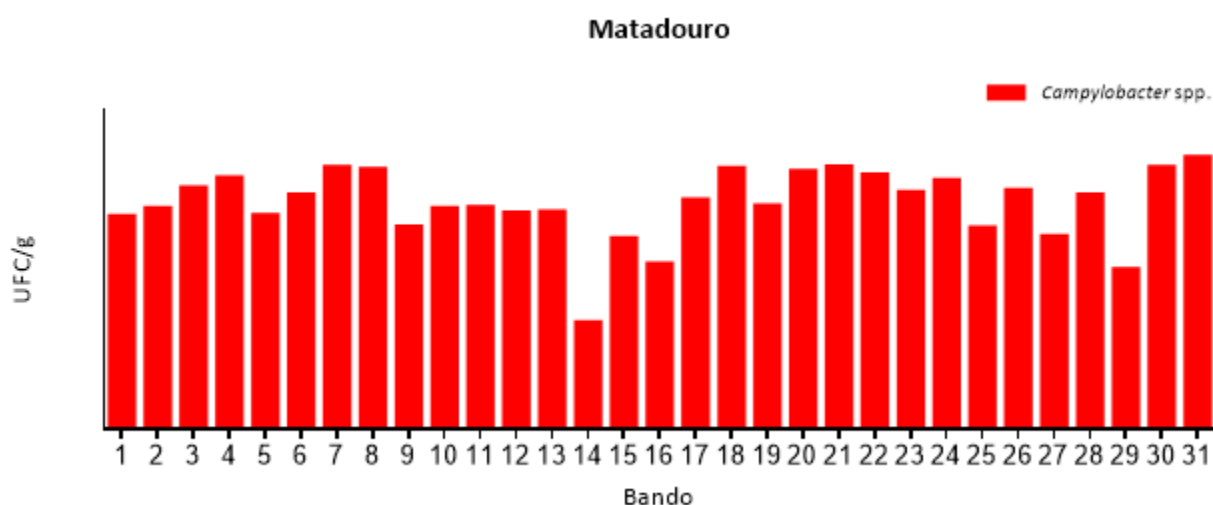


Gráfico 2 - Número de *Campylobacter* spp. nas amostras de fezes recolhidas no matadouro.

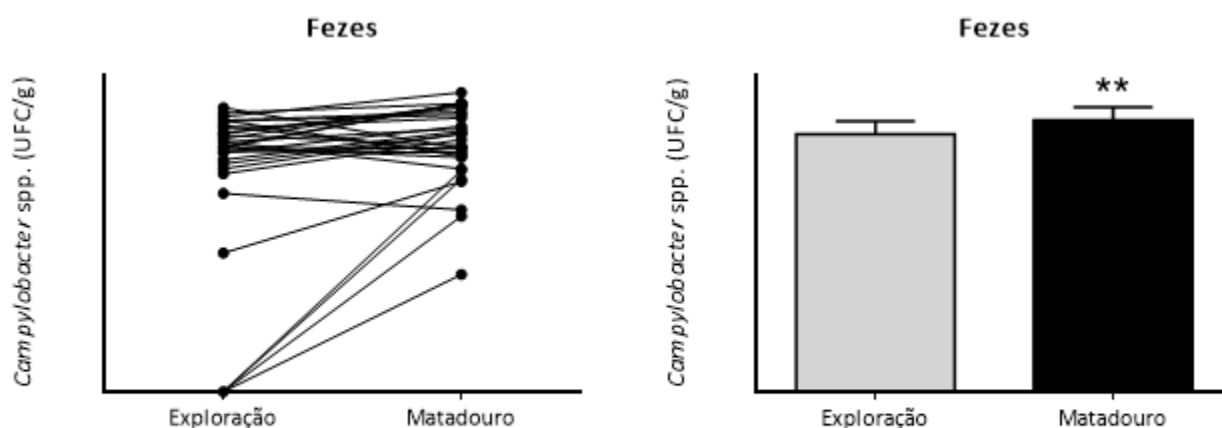


Gráfico 3 - Variação no número de *Campylobacter* spp. entre as amostras de fezes recolhidas nas explorações avícolas e no matadouro. A quantidade de *Campylobacter* spp. é maior no matadouro do que na exploração.

4. Relação entre fatores produtivos e contaminação das fezes por *C. jejuni* e *C. coli*

Com base na correlação de Spearman, não parece haver associação entre as variáveis produtivas quantitativas e a contaminação das fezes por *C. jejuni* e *C. coli*, nomeadamente:

- Eficácia produtiva;
- Efetivo total na exploração (número de aves);
- Dimensão do bando (número de aves);
- Duração do vazio sanitário (dias);
- Densidade vital (aves/m²);
- Idade (dias);
- Peso vivo no abate (kg);
- Índice de conversão alimentar;
- Consumo alimentar do bando (toneladas);
- Mortalidade acumulada (%)
- Tempo entre o primeiro desbaste na exploração e a recolha da amostra (dias);
- Tempo entre o primeiro desbaste do bando e a recolha da amostra (dias);
- Tempo entre a última administração de antibiótico e a recolha da amostra (dias).

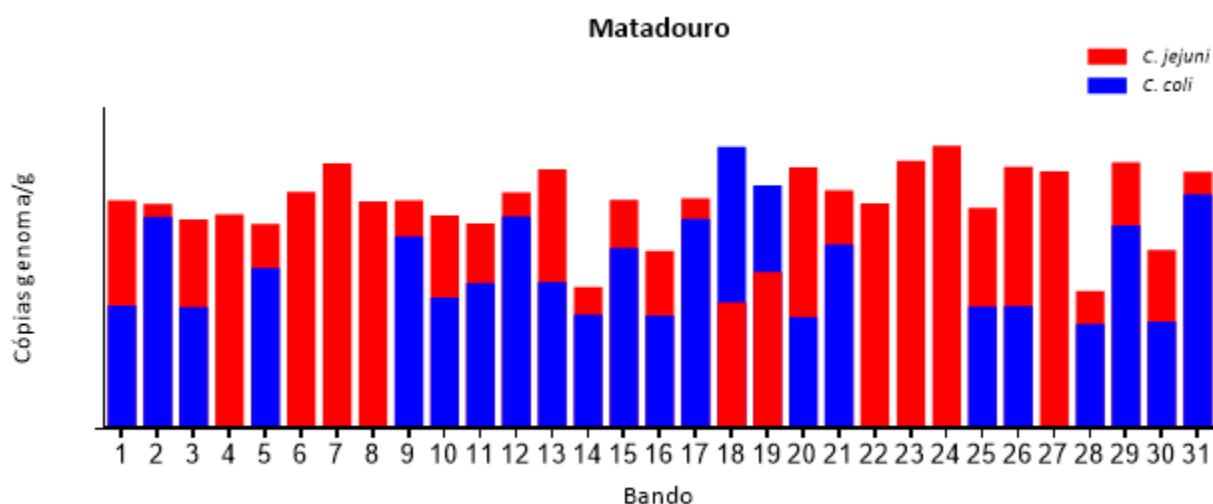


Gráfico 4 - Número de cópias de genoma de *C. jejuni* e *C. coli* nas amostras de fezes recolhidas no matadouro.

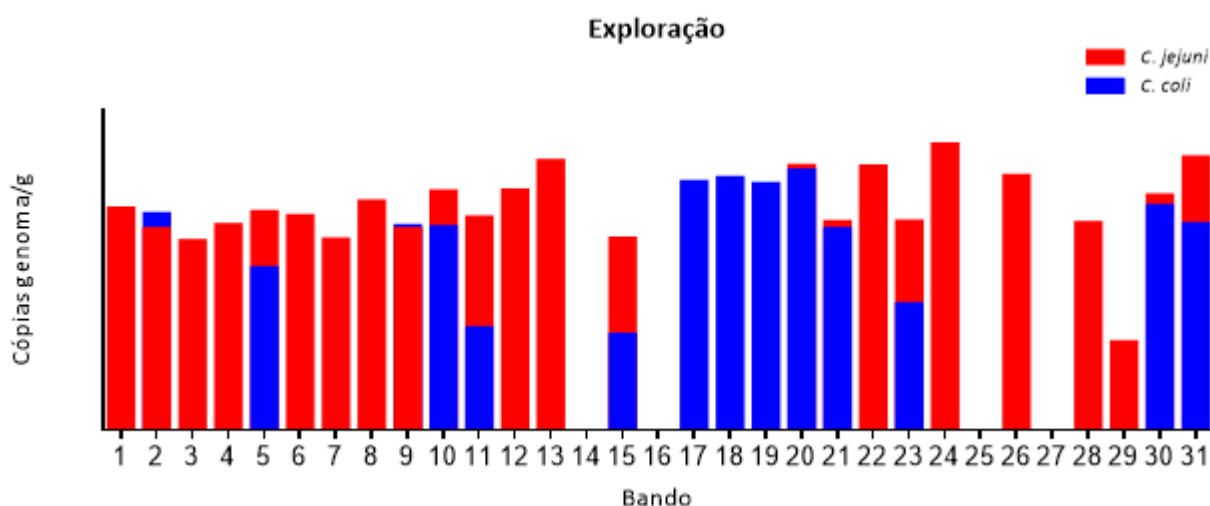


Gráfico 5 - Número de cópias de genoma de *C. jejuni* e *C. coli* nas amostras de fezes recolhidas na exploração.

5. Relação entre fatores produtivos e contaminação da pele por *C. jejuni* e *C. coli*

Com base na correlação de Spearman, parece haver associação entre as variáveis produtivas quantitativas e a contaminação da pele por *C. jejuni* e *C. coli*, nomeadamente:

- Eficácia produtiva, em que parece ter uma relação inversa com a contaminação por *C. coli* ($\rho = -0,4009$; $p = 0,0282$, teste de uma cauda);
- Efetivo total, em que parece ter uma relação direta com a contaminação por *C. jejuni* e *C. coli* ($\rho = 0,5020$; $p = 0,0020$, teste de uma cauda).
- Dimensão do bando, em que parece ter uma relação direta com a contaminação por *C. jejuni* e *C. coli* ($\rho = 0,3272$; $p = 0,0362$, teste de uma cauda).

- Contaminação das fezes por *C. jejuni* e *C. coli*, em que a associação parece ser direta com a contaminação por *C. jejuni* ($\rho = 0,7336$; $p < 0,0001$, teste de uma cauda) e com a contaminação por *C. coli* ($\rho = 0,6361$; $p < 0,0001$, teste de uma cauda).

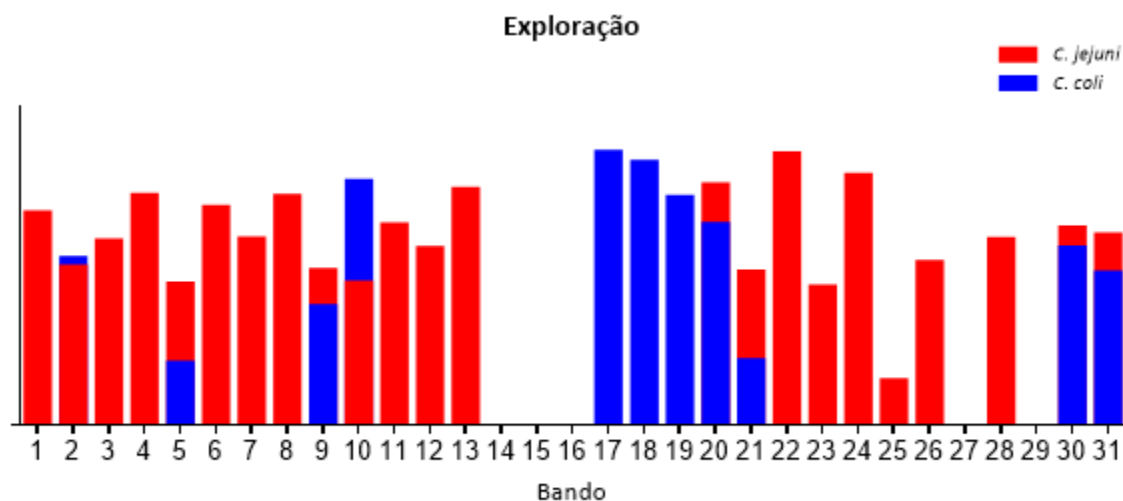


Gráfico 6 - Número de cópias de genoma de *C. jejuni* e *C. coli* nas amostras de pele recolhidas na exploração.

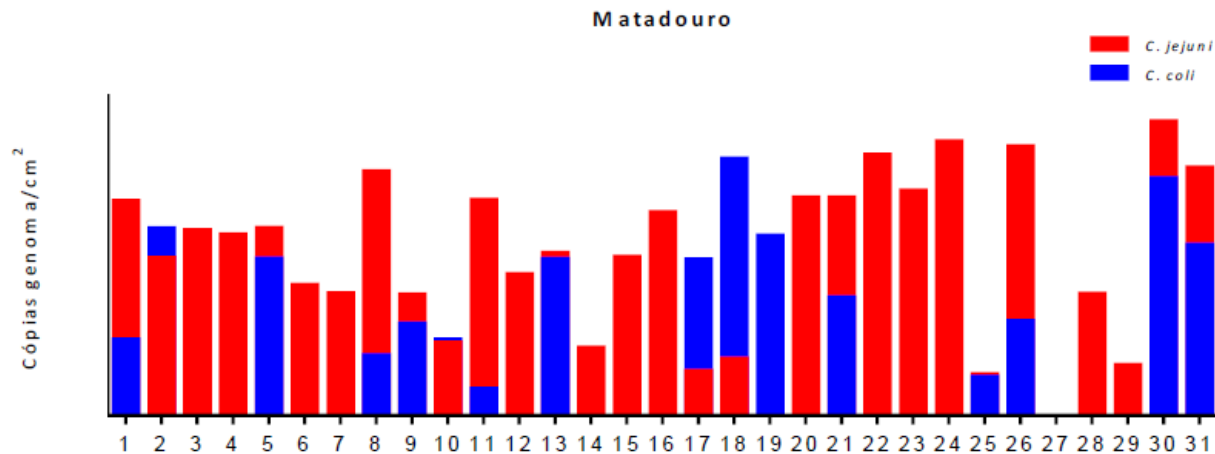


Gráfico 7 - Número de cópias de genoma de *C. jejuni* e *C. coli* nas amostras de pele recolhidas no matadouro.

Existe uma correlação entre a contaminação da pele por *Campylobacter* spp. no matadouro e na exploração ($\rho = 0,3706$; $p = 0.0201$, teste de uma cauda). Esta correlação é maior ($\rho = 0,5789$; $p = 0.0003$, teste de uma cauda) relativamente às fezes, também entre a exploração e o matadouro. Estas correlações corroboram o aumento significativo no número de células cultiváveis

Em relação às imagens obtidas por FISH estabeleceu-se uma categorização da morfologia das células bacterianas em três tipos: forma espiralada típica (I), forma cocóide (II) e formas de transição (III), conforme ilustrado na Figura 5.

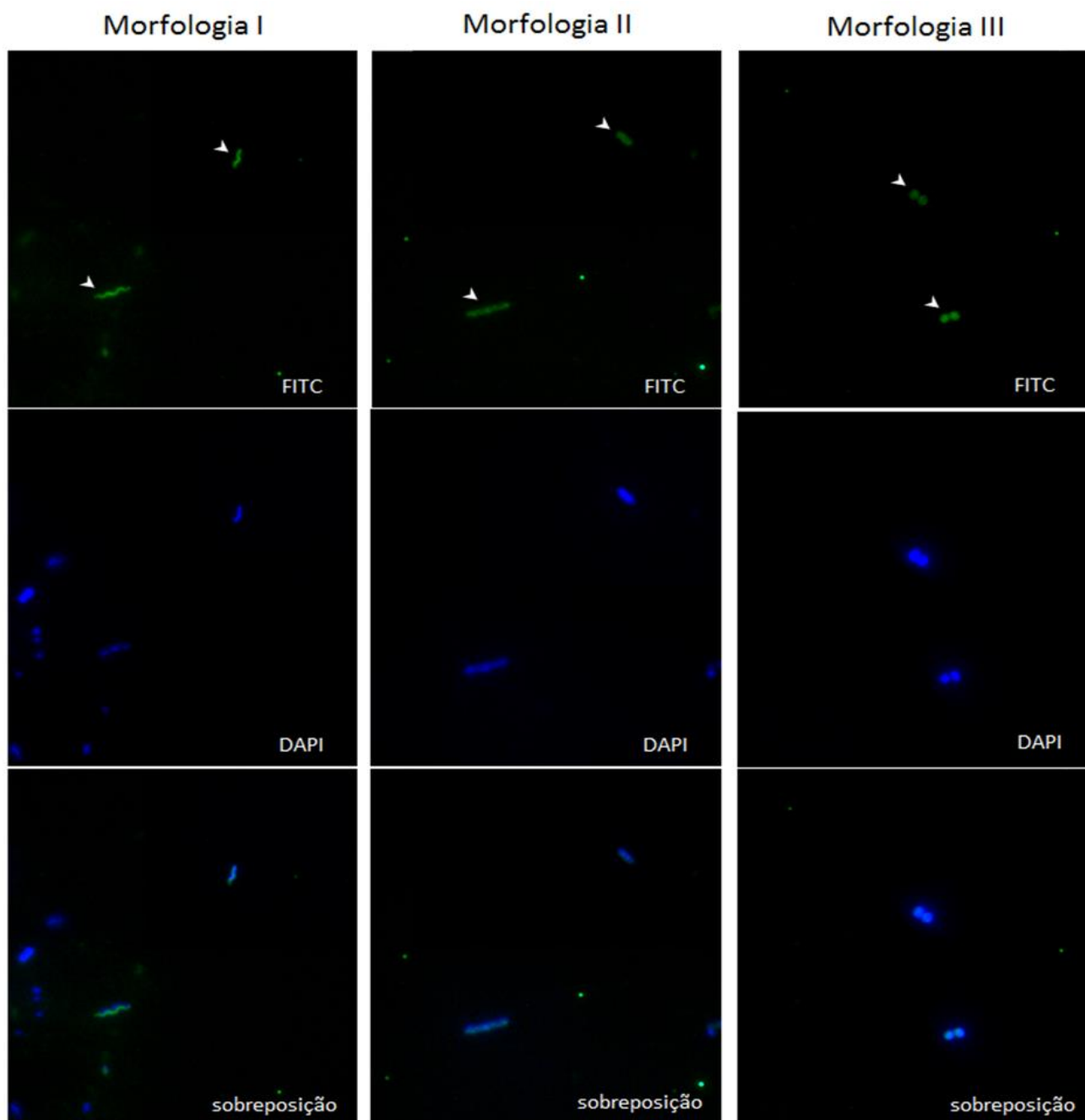


Figura 5 - Morfologias “tipo” de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e pele por FISH. Objetiva 100x. FITC (Isotiocianato de fluoresceína) para marcação de *Campylobacter* spp.; DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) para marcação de DNA

Discussão/Conclusão

Em termos gerais, verifica-se um aumento na excreção de *Campylobacter* spp. nas fezes no cais do matadouro em relação aos valores obtidos nas fezes recolhidas na exploração. É notória a disseminação de *Campylobacter* spp. nas explorações amostradas.

No matadouro todas as amostras de fezes foram positivas, havendo entre a exploração e o matadouro um aumento significativo no número de células viáveis de *Campylobacter* spp. nas fezes. A quantidade de *Campylobacter* spp. é, portanto, maior no matadouro, o que pode ser correlacionado, em termos gerais, com o tempo de permanência nas jaulas, tempo de jejum, tempo de transporte, número de animais por jaula e todos os restantes fatores que possam contribuir para o stress das aves.

Entre a exploração e o abate registou-se um aumento muito significativo no número de células viáveis presentes na pele dos frangos. Não se detetou *Campylobacter* spp. nas amostras fecais e cutâneas de quatro bandos e existe uma correlação direta entre os níveis de contaminação da pele obtidos na exploração e obtidos no matadouro.

Em relação às amostras de pele, em termos gerais verifica-se também um aumento bastante significativo entre as amostras recolhidas na exploração e a recolha no cais do matadouro.

Também no tocante ao número de cópias de genoma de *C. jejuni* na pele verificou-se um aumento significativo entre a exploração e o matadouro.

No que diz respeito ao desinfetante utilizado, o DMC-80 parece estar associado a uma menor excreção através das fezes e a uma menor contaminação da pele. Se atendermos à sua composição presente na tabela 1 do anexo I, ainda que muito empiricamente podemos comprovar que no que diz respeito à composição de cada um deles, verifica-se que são constituídos essencialmente pelos mesmos grupos de compostos, no entanto, o DMC-80 apresenta na sua composição ácido acético que, segundo alguns estudos comprovam, pode ter um efeito na redução da quantidade de *Campylobacter* spp.

A performance produtiva otimizada reduz o risco de excreção de *Campylobacter* spp. através das fezes, bem como o risco de contaminação da pele. Um elevado peso vivo ao abate também reduz o risco de contaminação da pele por *Campylobacter* spp. Por outro lado, uma mortalidade elevada, bem como uma contaminação alta das fezes por *Campylobacter* spp. aumentam significativamente o risco de contaminação da pele dos frangos na exploração.

Relativamente aos estudos em qPCR, nas amostras de fezes não se registou qualquer variação significativa entre a exploração e o abate no respeitante ao número de cópias de genoma de *C. jejuni* e *C. coli*, conforme referido. Este resultado sugere que não ocorre multiplicação significativa destas espécies entre os dois momentos da amostragem.

Verifica-se que o aumento da contaminação da pele durante o tempo de permanência nas jaulas de transporte é parcialmente contrariado pela perda de viabilidade das células bacterianas expostas ao oxigénio e humidade reduzida. Ou seja, mesmo perante uma contaminação fecal recente da pele, a elevada sensibilidade ecológica deste género bacteriano (ao oxigénio e baixa humidade) impõe uma redução no número de células cultiváveis. Esta evidência deve ser interpretada com precaução porque ela não diminui em nada a importância da contaminação cruzada durante o transporte.

O número de cópias de genoma de *C. jejuni* e *C. coli* nas fezes não parece ser influenciado por nenhum dos fatores de produção. Numa abordagem mais pormenorizada foi interessante verificar que na amostra número 13 recolhida na exploração isolou-se tanto ao nível das fezes, como ao nível da pele identificou apenas *C. jejuni*. No matadouro, foi possível identificar *C. jejuni*, *C. coli* e *C. hyointestinalis* nas fezes e na pele foi possível identificar a *C. jejuni* e *C. coli*. Tendo o tempo de permanência no cais sido de apenas 1 hora e 30 minutos e o de transporte foi de apenas 40 minutos, ficam grandes dúvidas em relação às possíveis fontes de contaminação por *C. hyointestinalis*. Mas atendendo à natureza e dimensão da exploração, ao histórico da presença de javalis nas imediações e ocasionalmente no interior desta, poderá ter sido durante o processo da recolha manual das aves para o abate, em que não se cumprem as regras de biossegurança, como a utilização de pedilúvios, calçado apropriado e roupa apropriada, que tenha ocorrido a contaminação e a sua amplificação durante o transporte e permanência no cais do matadouro. As amostras 14, 15, 16, 26, 28 e 29 apresentavam *C. hyointestinalis*. Cinco das seis explorações positivas tinham cão, o que pode ser uma das causas, em virtude destes animais poderem ser reservatórios desta espécie (Ridley *et al.* 2011). Apenas a exploração número 26 não apresentava cão.

No que diz respeito à dimensão destas seis explorações, quatro delas apresentavam uma capacidade inferior a 40 000 aves e duas entre 120 000 e 150 000 aves. As explorações número 14, 15, 16 e 28 estavam inseridas em meios rurais com campos agrícolas em seu redor e as normas de biossegurança eram insuficientes. Relativamente às camas das explorações número 15 e 28, o seu estado era mau e as aves apresentavam contaminação fecal evidente, ao contrário da número 28. Seria de esperar que ao nível da pele, nestas duas explorações, face as restantes, se obtivessem os valores mais elevados de *Campylobacter* spp. Efetivamente isso não se verificou na exploração número 28, mas a exploração número 15 apresentava resultados quantitativos consideravelmente mais elevados. A exploração número 26 é uma exploração com uma grande capacidade, com bastantes ciclos produtivos anuais, o que poderá ser um fator determinante neste caso. No que diz respeito a esta exploração, há também uma proximidade muito considerável com outras explorações, podendo ocorrer contaminação entre estas.

Relativamente à exploração correspondente à amostra número 16, apresentou positividade a *Campylobacter* spp., nomeadamente *C. fetus* e *C. hyointestinalis*, não se detetando outra espécie. Através de qPCR não se detetaram cópias de genoma de *C. coli* e *C. jejuni* e na exploração eram também nulas. Atendendo à localização da exploração, à existência de gado nos terrenos agrícolas contíguos à exploração e à existência de um cão, estas poderão ser as possíveis fontes de infeção. Acresce que a capacidade da exploração é bastante reduzida e não se cumpriam normas de biossegurança, como por exemplo o uso de pedilúvios.

No bando número 19 apenas se identificou *C. coli* nas fezes e na pele. Já no que diz respeito ao matadouro, nas fezes, verifica-se que há tanto *C. coli* como *C. jejuni*, o que permite afirmar que esta contaminação poderá ter ocorrido ao nível de transporte ou ao nível do cais do matadouro. Em relação às amostras cutâneas recolhidas no matadouro, o que se verifica é que não há uma alteração significativa e mantém-se apenas contaminada com *C. coli*, o que permite inferir que esta contaminação terá tido origem na exploração. Curiosamente o tempo de permanência no cais foi aproximadamente dez horas, aumentando o risco de contaminação cruzada. Nesta exploração, no mesmo dia ocorreu também a apanha de outro bando, pela mesma equipa, embora o transporte tenha sido efetuado por outro motorista e veículo. À semelhança do 19, também no bando número 18, apenas se identificou *C. coli* e nas amostras cutâneas enquanto que no matadouro apresentou tanto *C. coli* como *C. jejuni*. O tempo de permanência deste no cais foi de cinco horas, tendo sido portanto muito inferior ao anterior. No entanto a hora de chegada ao cais (04:50), poderá ter sido determinante, já que a esta hora havia uma grande quantidade de animais e a probabilidade de contaminação cruzada ocorrer, torna-se, obviamente superior.

Em relação à amostra número 24, mostrou-se positiva para *C. jejuni* e *C. lari*. No que diz respeito aos animais, esta exploração apresentava dois cães, pelo que estes poderiam perfeitamente ser o reservatório dessas espécies da *Campylobacter*. Está também descrito, como mencionado na revisão de literatura, que todas as espécies da *Campylobacter* podem ser contaminantes através da água, pelo que esta poderá ser também uma das possíveis causas (Jorgensen *et al.* 2011).

No que diz respeito às recolhas da exploração número 25, estas não apresentavam resultados positivos nas fezes para *C. coli* e *C. jejuni*, mas apresentavam nas recolhas da pele. Os baixos valores detetados nas fezes podem resultar do bando não se encontrar todo colonizado. Uma outra possível justificação pode dever-se ao facto da exploração ter uma capacidade reduzida e apresentar uma densidade animal baixa, uma vez que os fatores de stress não são, neste caso, muito expressivos. No entanto, na revisão de literatura está descrito que a transmissão horizontal para todos os animais do bando ocorre de forma muito rápida (Newell *et al.* 2011). Ainda em relação a esta amostra, é curiosa a

ausência de *C. lari*, já que esta exploração encontrava-se muito próxima da número 24, e havia mesmo partilha de algum material, o que poderia sugerir uma possível transmissão de um bando para o outro. O mesmo pressuposto se aplica ao número de cópias de genoma de *C. jejuni* e *C. coli*, uma vez que há uma discordância de valores muito significativo.

A amostra de fezes correspondente à exploração 27 não apresenta *C. jejuni* e *C. coli* a nível da exploração. No entanto, no matadouro a recolha de fezes comprova a existência de ambas e com um nível quantitativo bastante considerável. Este resultado apresenta-se discordante com o que seria de esperar, uma vez que a distância desta exploração ao matadouro é inferior a 20 km, não sendo expectável um elevado stress. Em relação ao tempo de espera no cais, superior a sete horas, poderá ser uma possível explicação. No que diz respeito à pele, não se verifica a presença de nenhuma das espécies previamente encontradas nas fezes no cais de matadouro, o que sugere que a infeção e propagação ocorreu no próprio cais, ou a própria recolha das fezes poder ter sido alvo de alguma possível contaminação, devido à proximidade das pilhas de outros bandos que se encontravam no cais nomeadamente os bandos das explorações número 28, 29, 30, 31 e outras não amostradas. Pode também ter ocorrido alguma falta de higienização e desinfeção no início da carga no camião ou nas caixas de transporte ou em ambas.

Se as amostras de fezes da exploração número 14 tinham sido negativas para *Campylobacter* spp. e *C. coli* e *C. jejuni*, tanto nas fezes como na pele, pode concluir-se que toda a contaminação que se obtém a nível das recolhas de matadouro resulta da contaminação cruzada a nível do cais de matadouro ou durante o transporte. O tempo entre o início da carga e o início de abate foi de aproximadamente 16 horas o que contribuiu, sem dúvida, para o grande stress dos animais, a distância percorrida foi de 100 km respetivamente, tudo isto resulta num enorme stress para os animais.

A elevada contaminação por *Campylobacter* spp. tanto a nível da pele como das fezes do bando 29 a nível de matadouro, pode ser devida ao tempo de permanência do cais, uma vez que este era um bando com estatuto sanitário desconhecido, tendo sido abatido apenas no final do dia.

Neste trabalho houve também repetição de amostras em explorações em ciclos produtivos diferentes. Foram amostradas duas explorações em que não houve qualquer alteração nas espécies de *Campylobacter* spp. detetadas nos diferentes ciclos de produção. No segundo ciclo de produção, na amostra correspondente à exploração número 19, registou-se ausência de *C. jejuni* nas amostras de fezes da exploração e do matadouro. Já no que diz respeito às análises da mesma exploração correspondentes a outras amostras (pavilhões diferentes) tal não se verificou este acontecimento e foram encontrados *C. jejuni* e *C. coli*. Atendendo à conformação da quinta em questão, isto permite afirmar que havendo normas de biossegurança adequadas dentro das explorações em pavilhões distintos, é possível ter bandos com prevalências distintas.

Em termos gerais há a salientar a grande densidade animal como fator preponderante, no que diz respeito à quantificação de *Campylobacter*, sendo que as explorações amostradas de maiores dimensões apresentam resultados mais elevados.

Há também a salientar que deve ser tida em consideração a sensibilidade ambiental deste microrganismo e que pode determinar falsos negativos pelos métodos clássicos.

Os resultados do FISH corroboram todas estas conjecturas, na medida em que nas amostras de pele as células com morfologia “viável” (morfologia I – típica espiralada) são minoritárias e bastante inferiores às detetadas nas fezes. Adicionalmente, as morfologias adotadas em resposta a grande stress ambiental (morfologia II e III - cocóides) foram as mais frequentes nas amostras de pele recolhidas nas explorações avícolas. É sabido que as alterações fisiológicas que acompanham esta configuração cocóide tornam muito difícil, ou mesmo impossível, o seu isolamento direto nos meios microbiológicos seletivos, apesar da célula microbiana se manter viável (e assim, detetável através do FISH ou qPCR) e com capacidade de proliferação, logo que as condições ecológicas em termos de disponibilidade de nutrientes, microaerofilia e humidade, lhe sejam favoráveis.

Já no matadouro, na pele dominou claramente a morfologia de transição (morfologia II - intermédia), que estava presente em todas as amostras de fezes, demonstrando a convicção anteriormente explanada sobre as consequências da contaminação fecal recente associada à permanência das aves nas jaulas de transporte. Ainda no respeitante às fezes, a morfologia II (intermédia) foi também claramente dominante nas amostras recolhidas na exploração. Porém, nestas últimas a sua frequência foi inferior à registada nas amostras recolhidas no matadouro, muito provavelmente devido ao maior efeito disgenésico sofrido na exploração.

Do ponto de vista geral, no que diz respeito aos valores quantitativos nas fezes apresentam uma relação inversa com a duração do vazio sanitário, o que está de acordo com a bibliografia, uma vez que quanto maior é o vazio sanitário, menor é a probabilidade de permanecerem agentes infecciosos na exploração para o ciclo produtivo seguinte. Já no que diz respeito ao tempo entre o primeiro desbaste e a recolha da amostra, há uma relação direta, o que corrobora o descrito em diversos estudos, uma vez que os fatores de stress na altura da apanha, associados à entrada na exploração das equipas de apanha podem contribuir para a introdução e proliferação do agente.

Já em relação aos níveis de *Campylobacter* spp. da pele, apresentam uma relação inversa com a mortalidade acumulada.

Três das quatro explorações em que não se detetou *Campylobacter* spp. nas fezes apresentavam um efetivo inferior a 40.000 aves, o que corrobora a quantidade animal à propagação deste microrganismo.

Entre a exploração e o abate registou-se um aumento no número células viáveis na pele dos frangos, o que era, segundo a bibliografia, expectável já que toda a etapa desde a apanha até ao abate implica fatores de stress, que contribuem para o aumento da excreção do *Campylobacter* spp. e intensifica a contaminação cruzada. Face às atuais condições de contenção, transporte e espera no matadouro é inevitável a contaminação fecal massiva da pele das aves. Assinale-se também que os níveis de contaminação detetados na pele são mais regulares no matadouro comparativamente aos verificados na exploração, muito provavelmente por decorrerem do contacto com fezes frescas ricas em formas viáveis de *Campylobacter* spp. No âmbito desta investigação não foi possível esclarecer o motivo justificativo da redução do rácio entre o número de *E. coli* e de *Campylobacter* spp. em amostras cutâneas recolhidas no matadouro durante a segunda metade do trabalho (a partir da amostra 18). Particularmente intrigante é o facto da redução do número de *E. coli* na pele não ter sido acompanhada pela redução do número de *Campylobacter* spp. Tal pode ter ficado a dever-se a uma alteração nos tempos de jejum praticados antes da recolha para abate, sendo expectável que tempos de jejum mais prolongados possam diminuir a contaminação por *E. coli* (mais abundantes em fezes com origem no íleo) e aumentar o número de *Campylobacter* spp., mais abundantes em fezes de origem cecal.

Em relação à presença de *C. hyointestinalis* em grande parte das explorações com cão, seria interessante analisar as fezes destes e verificar se efetivamente estes são importantes vetores ou não.

Há também a salientar que as explorações com maior dimensão e efetivo apresentaram maioritariamente *C. jejuni* e *C. coli* e os níveis de contaminação são consideravelmente superiores. A pressão animal exercida nas grandes explorações, contribui certamente para estes valores.

Em relação à amostra que permaneceu o menor tempo no cais, a número 6, permaneceu aproximadamente trinta minutos, verifica-se que em termos quantitativos há apenas uma variação residual nas amostras de pele recolhidas na exploração e no cais do matadouro. Esta exploração encontra-se a uma distância de 15 km do matadouro, pelo que os fatores de stress associados ao tempo de transporte são mínimos.

Em relação aos resultados contaminação das fezes por *Campylobacter* spp., em que a associação parece ser direta com a contaminação da pele, está de acordo com o esperado e com a literatura, uma vez que quanto maior for a excreção e contaminação nas fezes maior é a probabilidade de essa contaminação ocorrer a nível cutâneo. Isto está obviamente também relacionado com o estado das camas na exploração e com o tempo de permanência nas jaulas, já que este é um importante ponto de contaminação.

A amostra com eficácia produtiva de valor mais baixo corresponde à número 11. Realmente no que diz respeito a valores quantitativos absolutos de *C. coli* na pele, esta exploração é a que apresenta valores mais baixos. Embora possa haver um viés na utilização direta do índice de eficácia produtivo, do ponto de vista económico, mas do ponto de vista zootécnico não. Se estivermos a utilizar uma densidade animal inferior em termos económicos temos um menor rendimento por área.

Contrariamente ao que esperava, uma das piores explorações, em termos visuais, número 15, que o aspeto geral dos animais muito sujo e as camas estavam péssimas constatou-se que na exploração as aves não apresentavam *Campylobacter* spp. na pele, ao contrário do que seria de esperar. Foi também uma das explorações em que se verificou um de índice de eficácia de produtividade bastante elevado.

Seria interessante também realizar análises à água de lavagem das jaulas e dos veículos de transporte para averiguar a possível contaminação, através dos mesmos métodos de análise.

Curioso é também que ainda que num raciocínio muito pouco lógico as explorações que apresentaram resultados de *Campylobacter* spp. mais baixos em termos genéricos, são as dotadas de menor tecnologia e também medidas de biossegurança.

Face às discrepâncias de resultados gerados neste trabalho entre a microbiologia clássica (pesquisa de *Campylobacter* spp.) e o qPCR, face à enorme dificuldade experimental em diferenciar em cultura as colónias de *C. jejuni* de outras espécies, a haver no futuro um controlo oficial quantitativo sobre a contaminação por *C. jejuni* da pele das carcaças de frango após o abate, deverá existir uma enorme prudência na validação desses resultados. No alcance das conclusões deste estudo, tal avaliação deveria ser realizada através de qPCR.

Estratégias de controlo

Uma das possíveis soluções passa pela diminuição do tempo de espera dos animais no cais, de forma a diminuir a excreção de *Campylobacter* spp. A diminuição do tempo de transporte, bem como a escolha de rotas mais curtas e o mais diretas possíveis são pontos a ponderar.

No que diz respeito às jaulas, a diminuição do número de animais por jaula, juntamente com um sistema de jaulas que não permita a passagem de fezes para as jaulas situadas em níveis inferiores, seria uma forma de diminuir a contaminação cutânea por *Campylobacter*. Também se deverá assegurar que há um distanciamento considerável entre as jaulas de animais provenientes de explorações diferentes, para diminuir a possibilidade de contaminação cruzada.

A existência de equipas de apanha diferentes, exclusivamente para efetuar desbastes na exploração ou para efetuar a apanha, permitiria reduzir o número de explorações positivas ao *Campylobacter*, já que iria haver uma menor circulação de pessoas entre explorações.

Outra medida preventiva seria não utilizar no mesmo dia os veículos de apanha em explorações diferentes, sem proceder a uma correta higienização e desinfecção e, idealmente, caso seja possível do ponto de vista logístico, realizar em primeiro lugar a apanha de explorações nas quais não vão ser retirados todos os animais. Realizar as apanhas mais tarde e prolongar pela parte da manhã, para permitir que os animais permaneçam pouco tempo no cais antes do abate. Realizar os abates preferencialmente nos matadouros do grupo mais próximos das explorações. Reduzir o tempo possível de jejum, na exploração, já que esta prática é um fator indutivo de stress, o que leva ao aumento da excreção de *Campylobacter* antes da apanha. Assegurar que todas as áreas da exploração se encontram vedadas e não permitem a entrada de animais selvagens. Instituir e fazer cumprir programas de controlo de pragas e insetos nas quintas de produção, de forma a eliminar possíveis vetores que permaneçam e permitam perpetuar a disseminação do agente. Dar formação e transmitir conhecimentos, alertar para o possível alarmismo do consumidor, já que esta é uma questão que está na ordem do dia e pode eventualmente surgir nos meios de comunicação social. É também importante a lavagem dos pavilhões, linhas de água, e todo o restante material ser bem efetuada e utilizar desinfetantes nas concentrações indicadas pelos fornecedores. Em relação aos biofilmes, como descrito não só em relação ao *Campylobacter* spp. mas também em relação a outros microrganismos, é importante combater a sua formação e atuar profilaticamente, realizando limpezas e desinfecções periódicas de todos os equipamentos mais suscetíveis de sofrerem este processo.

Em relação aos processos de abate, as possíveis medidas passam por uma calibragem correta da depenadora, da máquina de evisceração, mudança de água do escaldão periodicamente, já que a temperatura desta não é suficiente para destruir o microrganismo e, em geral, ter boas práticas de higiene. No entanto, estas medidas deverão ser investigadas mais aprofundadamente.

De nada adianta instituir medidas rigorosas e eficazes de segurança se as mesmas não forem meticolosas e sistematicamente, uma vez que são as exceções que desencadeiam problemas maiores. Assim sendo é fundamental que todas os colaboradores cumpram e façam cumprir.

É necessário tomar medidas, fazer estudos, tirar conclusões e agir de acordo com os resultados obtidos, já que este é um assunto da maior importância, devendo existir preparação para intervir de forma profilática em todas as fases da fileira produtiva. Faz sentido realizar um estudo com os mesmos métodos a jusante desta fase produtiva, averiguando que tipo de valores de contaminação se obtém e em que etapas ocorrem.

Bibliografia

- Alfredson, D. A., & Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x>
- Ansari-Lari, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., Abdollahi, M., & Berizi, E. (2011). Prevalence and risk factors associated with campylobacter infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 475–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.003>
- Awad, W. A., Aschenbach, J. R., Ghareeb, K., Khayal, B., Hess, C., & Hess, M. (2014). *Campylobacter jejuni* influences the expression of nutrient transporter genes in the intestine of chickens. *Veterinary Microbiology*, 172(1–2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.001>
- Awad, W. a, Molnár, A., Aschenbach, J. R., Ghareeb, K., Khayal, B., Hess, C., ... Hess, M. (2015). *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. *Innate Immunity*, 21(2), 151–60. <https://doi.org/10.1177/1753425914521648>
- Axelsson-Olsson, D., Waldenström, J., Broman, T., Olsen, B., & Holmberg, M. (2005). Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 987–992. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.987-992.2005>
- Barrios, P. R., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J. R., Michel, P., Fridriksdóttir, V., ... Martin, W. (2006). Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks in Iceland. *Preventive Veterinary Medicine*, 74(4), 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.12.003>
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M. L., & Engvall, A. (1996). *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *International Journal of Food Microbiology*, 32(1–2), 35–47. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01102-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01102-6)
- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>
- Booth, I. R., & Higgins, C. F. (1990). Enteric bacteria and osmotic stress: Intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? *FEMS Microbiology Letters*, 75(2–3), 239–246. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90534-W](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90534-W)
- Boysen, L., Rosenquist, H., Larsson, J. T., Nielsen, E. M., Sørensen, G., Nordentoft, S., & Hald, T. (2013). Source attribution of human campylobacteriosis in Denmark. *Epidemiology and Infection*, 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002719>

- Buhr, R. J., Cox, N. A., Stern, N. J., Musgrove, M. T., Wilson, J. L., & Hiett, K. L. (2002). Recovery of *Campylobacter* from Segments of the Reproductive Tract of Broiler Breeder Hens. *Avian Diseases*, 46(4), 919–924. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0919:ROCFSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0919:ROCFSO]2.0.CO;2)
- Bull, S. A., Allen, V. M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., Ure, R., ... Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2006). Sources of *Campylobacter* spp . Colonizing Housed Broiler Flocks during Rearing, 72(1), 645–652. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.645>
- Bull, S. A., Thomas, A., Humphrey, T., Ellis-Iversen, J., Cook, A. J., Lovell, R., & Jorgensen, F. (2008). Flock health indicators and *Campylobacter* spp. in commercial housed broilers reared in Great Britain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5408–5413. <https://doi.org/10.1128/AEM.00462-08>
- Cogan, T. A., Thomas, A. O., Rees, L. E. N., Taylor, A. H., Jepson, M. A., Williams, P. H., ... Humphrey, T. J. (2007). Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut*, 56(8), 1060–5. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.114926>
- Coward, C., Van Diemen, P. M., Conlan, A. J. K., Gog, J. R., Stevens, M. P., Jones, M. A., & Maskell, D. J. (2008). Competing isogenic *Campylobacter* strains exhibit variable population structures in vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3857–3867. <https://doi.org/10.1128/AEM.02835-07>
- Cox, N. A., Richardson, L. J., Maurer, J. J., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., Buhr, R. J., ... Doyle, M. P. (2012). Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her Progeny. *Journal of Food Protection*, 75(10), 1896–1902. <https://doi.org/10.4315/0362-028.JFP-11-322>
- Crim, S. M., Iwamoto, M., Huang, J. Y., Griffin, P. M., Gilliss, D., Cronquist, A. B., ... Henao, O. L. (2013). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2012. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62(15), 283–287. <https://doi.org/mm6215a1> [pii]
- De Boer, P., Wagenaar, J. A., Achterberg, R. P., Van Putten, J. P. M., Schouls, L. M., & Duim, B. (2002). Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Molecular Microbiology*, 44(2), 351–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02930.x>
- De Cesare, A., Sheldon, B. W., Smith, K. S., & Jaykus, L.-A. (2003). Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1587–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14503710>

- EFSA. (2010). EFSA Journal. *EFSA Journal*, 8(3), 1459. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1459>.
- EFSA. (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA Journal*, 13(12), 4329. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2014). EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates, (March).
- Fernandez, H., Salazar, R., & Landskron, E. (1993). Occurrence of Thermotolerant Species of *Campylobacter* in 3 Groups of Hens Maintained under Different Environmental-Conditions. *Revista De Microbiologia*, 24(4), 265–268.
- Fonseca, B. B., Soncini, R. A., Gima  es, A. R., & Rossi, D. A. (2006). *Campylobacter* sp in eggs from cloacal swab positive breeder hens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 573–575. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400032>
- Garcia-migura, L., Hendriksen, R. S., Fraile, L., & Aarestrup, F. M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe : The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 170(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.013>
- Gar  naux, A., Jugiau, F., Rama, F., De Jonge, R., Denis, M., Federighi, M., & Ritz, M. (2008). Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: Effect of temperature. *Current Microbiology*, 56(4), 293–297. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9082-8>
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D. W., Stern, N. J., & Corn, J. L. (1997). Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Diseases*, 41(4), 890–898. <https://doi.org/10.2307/1592343>
- Hald, B., Rattenborg, E., & Madsen, M. (2001). Role of batch depletion of broiler houses on the occurrence of *Campylobacter* spp. in chicken flocks. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 253–256. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00896.x>
- Hammerl, J. A., J  ckel, C., Alter, T., Janczyk, P., Stingl, K., Kn  ver, M. T., & Hertwig, S. (2014). Reduction of *campylobacter jejuni* in broiler chicken by successive application of group II and group III phages. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114785>
- Hansson, I., V  gsholm, I., Svensson, L., & Olsson Engvall, E. (2007). Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *Journal of Applied*

- Microbiology*, 103(3), 640–649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03291.x>
- Haruna, M., Sasaki, Y., Murakami, M., Ikeda, A., Kusukawa, M., Tsujiyama, Y., ... Yamada, Y. (2012). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* in Broiler Flocks in Japan. *Zoonoses and Public Health*, 59(4), 241–245. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01441.x>
- Hazeleger, W. C., Janse, J. D., Koenraad, P. M. F. J., Beumer, R. R., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1995). Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2713–2719.
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., ... Haesebrouck, F. (2012). Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12(2), 89–98. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0676>
- Humphrey, S., Chaloner, G., Kemmett, K., Davidson, N., Williams, N., Kipar, A., ... Wigley, P. (2014). *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *mBio*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01364-14>
- Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 237–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006>
- Jennings, J. L., Sait, L. C., Perrett, C. A., Foster, C., Williams, L. K., Humphrey, T. J., & Cogan, T. A. (2011). *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.005>
- Jerome, J. P., Bell, J. A., Plovanich-Jones, A. E., Barrick, J. E., Brown, C. T., & Mansfield, L. S. (2011). Standing genetic variation in contingency loci drives the rapid adaptation of *Campylobacter jejuni* to a novel host. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016399>
- Jorgensen, F., Ellis-Iversen, J., Rushton, S., Bull, S. A., Harris, S. A., Bryan, S. J., ... Humphrey, T. J. (2011). Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3741–3748. <https://doi.org/10.1128/AEM.02444-10>
- Kaakoush, N. O., Castano-Rodriguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global epidemiology of campylobacter infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>

- Keener, K. M. K. M., Bashor, M. P. M. P., Curtis, P. A., Sheldon, B. W., & Kathariou, S. (2004). Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *{...} Reviews in Food {...}*, 3(2), 105–116. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00060.x>
- Keller, J., Wieland, B., Wittwer, M., Stephan, R., & Perreten, V. (2007). Distribution and Genetic Variability Among *Campylobacter* spp . Isolates from Different Animal Species and Humans in Switzerland, 54, 2–7.
- Levin, R. E. (2007). *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnology*, 21(4), 271–347. <https://doi.org/10.1080/08905430701536565>
- Lopez, C., Agostini, A., Giacoboni, G., Cornero, F., Tellechea, D., & Trinidad, J. J. (2003). [Campylobacteriosis in a low-income community in Buenos Aires, Argentina]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 22(3), 1013–1020.
- Louis, P., & O’Byrne, C. P. (2010). Life in the gut: Microbial responses to stress in the gastrointestinal tract. *Science Progress*, 93(1), 7–36. <https://doi.org/10.3184/003685009X12605525292307>
- McDowell, S. W. J., Menzies, F. D., McBride, S. H., Oza, A. N., McKenna, J. P., Gordon, A. W., & Neill, S. D. (2008). *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: Epidemiology and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 84(3–4), 261–276. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.12.010>
- Muellner, P., Pleydell, E., Pirie, R., Baker, M. G., Campbell, D., Carter, P. E., & French, N. P. (2013). Molecular-based surveillance of campylobacteriosis in New Zealand - From source attribution to genomic epidemiology. *Eurosurveillance*, 18(3), 1–7.
- Mughini Gras, L., Smid, J. H., Wagenaar, J. A., de Boer, A. G., Havelaar, A. H., Friesema, I. H. M., ... van Pelt, W. (2012). Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: A combined case-control and source attribution analysis. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042599>
- Murphy, C., Carroll, C., & Jordan, K. N. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02903.x>
- Newell, D. G., Elvers, K. T., Dopfer, D., Hansson, I., Jones, P., James, S., ... Allen, V. M. (2011). Biosecurity-Based Interventions and Strategies To Reduce *Campylobacter* spp . on Poultry Farms □, 77(24), 8605–8614. <https://doi.org/10.1128/AEM.01090-10>
- Newell, D. G., & Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens.

Applied and Environmental Microbiology, 69(8), 4343–4351.

<https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4343>

Oberhelman R, T. DE. (2000). *Campylobacter infections in developing countries*.

Olson, C. K., Ethelberg, S., van Pelt, W., & Tauxe, R. V. (2008). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections in Industrialized Nations. In *Campylobacter, Third Edition* (pp. 163–189).

<https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch9>

Poppert, S., Haas, M., Yildiz, T., Alter, T., Bartel, E., Fricke, U., & Essig, A. (2008). Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 2133–2136. <https://doi.org/10.1128/JCM.01512-07>

Portner, D. C., Leuschner, R. G. K., & Murray, B. S. (2007). Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*, 54(3), 265–270.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.03.002>

Potturi-Venkata, L.-P., Backert, S., Lastovica, A. J., Vieira, S. L., Norton, R. A., Miller, R. S., ... Oyarzabal, O. A. (2007). Evaluation of Different Plate Media for Direct Cultivation of *Campylobacter* Species from Live Broilers. *Poultry Science*, 86, 1304–1311.

<https://doi.org/10.1093/ps/86.7.1304>

Ridley, A., Morris, V., Gittins, J., Cawthraw, S., Harris, J., Edge, S., & Allen, V. (2011). Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: Contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), 233–244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05038.x>

Rivoal, K., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., & Ermel, G. (2005). Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6216–6227. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6216-6227.2005>

Rosenquist, H., Sommer, H. M., Nielsen, N. L., & Christensen, B. B. (2006). The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 226–232.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.007>

Seliwiorstow, T., Baré, J., Berkvens, D., Van Damme, I., Uyttendaele, M., & De Zutter, L. (2016). Identification of risk factors for *Campylobacter* contamination levels on broiler carcasses during the slaughter process. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 26–32.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.010>

Sheppard, S. K., Dallas, J. F., Strachan, N. J. C., Macrae, M., Noel, D., Wilson, D. J., ... Forbes, K. J.

- (2014). Europe PMC Funders Group *Campylobacter* Genotyping to Determine the Source of Human Infection, 48(8), 1072–1078. <https://doi.org/10.1086/597402.Campylobacter>
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., & Rautelin, H. I. K. (2016). Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>
- Snelling, W. J., McKenna, J. P., Lecky, D. M., & Dooley, J. S. G. (2005). Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5560–5571. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5560-5571.2005>
- Soerjadi, A. S., Snoeyenbos, G. H., & Weinack, O. M. (1982). Intestinal colonization and competitive exclusion of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in young chicks. *Avian Dis*, 26(3), 520–524. <https://doi.org/Doi 10.2307/1589897>
- Sommer, H. M., H??g, B. B., Larsen, L. S., S??rensen, A. I. V., Williams, N., Merga, J. Y., ... Rosenquist, H. (2016). Analysis of farm specific risk factors for *Campylobacter* colonization of broilers in six European countries. *Microbial Risk Analysis*, 2–3, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.mran.2016.06.002>
- Stern, N. J., and Kazmi, S. U. (1989). No Title. *Foodborne Bacterial Pathogens*, Ed. M. P. Doyle, 71–110.
- Stern, N. J., & Kotula, A. W. (1982). K-, 44(5), 1150–1153.
- Svensson SL, Hyunh S, Parker CT, G. E. (2015). The *Campylobacter jejuni* CprRS two-component regulatory system regulates aspects of the cell envelope. *Mol. Biology*, 96, 189–209.
- Tudor, D. (1954). A liver degeneration of unknown origin in chickens. *J Am Vet Med Assoc*, 125, 219–220.
- Van Deun K, Pasmans F, Ducatelle R, Flahou B, Vissenberg K, Martel A, V. den B. W., & Van Immerseel F, H. F. (2008). Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet Microbiol*, 130, 285–297.
- Vandamme, P., Gevers, D., & Debruyne, L. (2008). Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. In *Campylobacter*, Third Edition (pp. 3–25). <https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch1>
- Vondrakova, L., Pazlarova, J., & Demnerova, K. (2014). Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, coli and lari in food matrices all at once using multiplex qPCR. *Gut Pathog*, 6(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-12>
- WHO, W. H. O. (2011). Food Safety. *W.H.O.*, (2000), 1. Retrieved from <http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/20questions/en/>
- Whyte, P., Collins, J. D., McGill, K., Monahan, C., & O'Mahony, H. (2001). The effect of

transportation stress on excretion rates of campylobacters in market-age broilers. *Poultry Science*, 80(6), 817–820. <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.817>

Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*, 2013.

Wilson, D. L., Bell, J. A., Young, V. B., Wilder, S. R., Mansfield, L. S., & Linz, J. E. (2003). Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture. *Microbiology*, 149(12), 3603–3615. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26531-0>

Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E. M., Gerner-Smidt, P., Wegener, H. C., & Mølbak, K. (2006). Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 280–284. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050936>

Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., ... Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(11), 1467–1473. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47363-0>

Anexos

Nome Comercial	Empresa Fabricante	Composição					
Virkon®	Antec International Limited	Peroxomonosulfato sódio 50%	Acido Sulfamico 5%	Alquibenzeno sulfato de sódio			
Viragri Plus VT49®	Diversey Inc	Glutaral -10-20%	Quaternarios amonia -3-10%	Acido fosfórico	cloretos	etilenodia minotetraacetato de tetrasodio	R-p-menta-1,8-dieno
viroid®	Cid Lines S.A - Belgica	Glutaraldeido	benzalkonium	isopropanolol	cloreto de dimecilmetil amonio		
DMC-80®	Mistolin S.A	Glutaraldeido	Cloreto de didecilmetilamonio 15 < 30	Quaternarios amonia -5-15%	propan-2-ol	acido etidróico	acido acético

Tabela 1 - Desinfetantes utilizados nas explorações

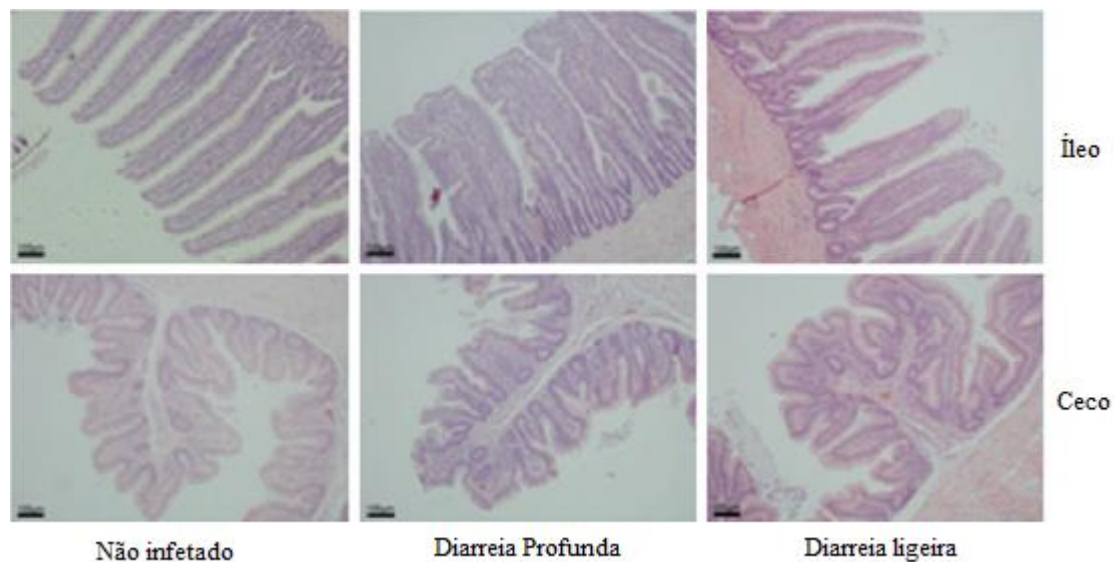


Figura 6 - Comparação entre epitélios intestinais de animais com *C. jejuni* e sem *Campylobacter* spp.